

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Monitoramento da resistência a herbicidas inibidores da EPSPs e genômica populacional de *Digitaria insularis* nas principais regiões produtoras de soja do Brasil

Acácio Gonçalves Netto

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

**Piracicaba
2020**

Acácio Gonçalves Netto
Engenheiro Agrônomo

Monitoramento da resistência a herbicidas inibidores da EPSPs e genômica populacional de *Digitaria insularis* nas principais regiões produtoras de soja do Brasil

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Co-orientadora:
Prof. Dra. **MARIA IMACULADA ZUCCHI**

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

Piracicaba
2020

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

Gonçalves Netto, Acácio

Monitoramento da resistência a herbicidas inibidores da EPSPs e genômica populacional de *Digitaria insularis* nas principais regiões produtoras de soja do Brasil / Acácio Gonçalves Netto. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

81p.

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

1. Capim-amargoso 2. Glifosato 3. Base-line 4. Dinâmica populacional I.
Título

A minha querida esposa, Izabely,
a minha amada filha, Bianca,
aos meus pais, Nivaldo e Márcia,
e ao meu estimado irmão, Rhafael

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- À Deus pela minha existência e à toda minha família, por me darem todo apoio, dedicação, companhia e paciência durante os períodos mais importantes da minha graduação e pós-graduação;
- À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, em especial ao Programa de Pós-graduação em Fitotecnia da ESALQ/USP e ao Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP, pela oportunidade concedida na realização deste trabalho;
- À minha querida esposa Izabely Carvalho Luz, por toda a dedicação, companhia e paciência durante os períodos mais importantes de toda minha pós-graduação;
- À minha amada filha Bianca Carvalho Gonçalves Luz, razão de tudo, pela compreensão nas minhas ausências e pelo carinho nas horas difíceis;
- Aos meus pais e meu irmão (Márcia, Nivaldo e Rhafael), por me darem todo apoio e ensinamentos ao longo da minha vida;
- À minha sogra Ana Maria Carvalho Luz (in memoriam), meu sogro José Hercio da Luz e meu cunhado Izaltino Pereira da Luz Netto, pessoas que sempre acreditaram e incentivaram meu trabalho;
- Ao Professor Dr. Pedro Jacob Christoffoleti pela orientação, amizade, colaboração, oportunidade e pelas suas contribuições à minha formação profissional;
- À Professora Dra. Maria Imaculada Zucchi, exemplo de otimismo, pela valiosa co-orientação, pela oportunidade, por acreditar desde o início neste trabalho, pela paciência em todas as etapas, pelas importantes contribuições e pela amizade;
- Ao meu amigo Eng. Agrônomo Dr. Marcelo Nicolai por todos os ensinamentos, pelo companheirismo, amizade, sugestões, paciência nas diferentes situações enfrentadas e pelo profissional no qual ajudou a me transformar;
- Ao meu amigo Professor Dr. Saul Jorge Pinto de Carvalho pela amizade, companheirismo e auxílio em todas as etapas de minha carreira profissional;
- Ao Engenheiro Agrônomo Dr. Ramiro López-Ovejero pela grande contribuição, pelas valiosas conversas e pela amizade;

- Ao amigo, Engenheiro Agrônomo, MSc. Marcelo Rafael Malardo pelo companheirismo, auxílio nas pesquisas e principalmente pelas valiosas conversas;
- As amigas de longa data, Engenheiras Agrônomas, Jessica Cursino Presoto e Jeisiane de Fátima Andrade pela grande contribuição em toda pós-graduação, pelos momentos de descontração e amizade;
- Ao amigo, Engenheiro Agrônomo, Luiz Henrique Franco de Campos pelo companheirismo e ensinamentos;
- À toda equipe do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da UNICAMP, principalmente ao Biólogo Dr. Alessandro Alves Pereira e a Química Aline da Costa Lima Moraes, pela paciência e pela grande contribuição na elaboração das bibliotecas de GBS, parte importante desse trabalho;
- À todo Grupo de Genética e Genômica da Conservação do APTA, em especial ao Biólogo Dr. Carlos Eduardo de Araújo Batista pela grande contribuição na execução deste trabalho;
- Ao Engenheiro Agrônomo Dr. Erick Mauricio Goes Cordeiro, pela grande contribuição com este trabalho;
- À Bayer CropScience Brasil em especial ao Engenheiro Agrônomo Dr. Marcel Sereguin Cabral de Melo e ao Líder de Assuntos Científicos Guilherme Cruz pela grande colaboração, sem a qual este trabalho não seria possível;
- À Agrocon Assessoria Agronômica e toda sua equipe por todo suporte concedido para a realização dos experimentos;
- Aos professores e funcionários do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP, em especial à Luciane Aparecida Lopes Toledo por todo auxílio, dedicação e paciência nas questões administrativas;
- Ao CNPQ pela bolsa concedida.

MUITO OBRIGADO.

*“Não é o mais forte de uma espécie que sobrevive, nem o mais inteligente, e sim aquele que
melhor se adapta”*

Charles Darwin

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
Referências.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Plantas daninhas.....	15
2.2 Capim-amargoso (<i>Digitaria insularis</i>)	16
2.3 Interferência das plantas daninhas no sistema de produção.....	18
2.4 Resistência de plantas daninhas aos herbicidas.....	19
2.5 Monitoramento da resistência.....	20
2.6 Diversidade genética em populações de plantas	21
2.7 Fluxo gênico em espécies vegetais	23
Referências.....	24
3 “BASE-LINE” DE SUSCETIBILIDADE DE POPULAÇÕES DE <i>Digitaria insularis</i> AO GLIFOSATO.....	29
Resumo.....	29
Abstract.....	29
3.1 Introdução.....	30
3.2 Material e Métodos.....	31
3.3 Resultados e Discussão.....	35
3.4 Conclusões.....	43
Referências.....	43
4 MONITORAMENTO DA DISPERÇÃO DE <i>Digitaria insularis</i> RESISTENTE AO GLIFOSATO EM ÁREAS PRODUTORAS DE SOJA DO BRASIL.....	47
Resumo.....	47
Abstract.....	47
4.1 Introdução.....	48
4.2 Material e Métodos.....	49
4.3 Resultados e Discussão.....	51
4.4 Conclusões.....	54
Referências.....	54

5 GENÔMICA POPULACIONAL DE <i>Digitaria insularis</i> NAS PRINCIPAIS REGIÕES PRODUTORAS DE SOJA NO BRASIL.....	57
Resumo.....	57
Abstract.....	57
5.1 Introdução.....	58
5.2 Material e Métodos.....	60
5.3 Resultados	64
5.4 Discussão	70
5.5 Conclusões.....	75
Referências.....	76
6 CONCLUSÕES GERAIS	81

RESUMO

Monitoramento da resistência a herbicidas inibidores da EPSPs e genômica populacional de *Digitaria insularis* nas principais regiões produtoras de soja no Brasil

A expansão de áreas agrícolas no Centro-Oeste brasileiro com culturas resistentes ao glifosato (culturas RR), têm contribuindo para a seleção de biótipos resistentes de plantas daninhas. Isto se deve à elevada pressão de seleção exercida pelo uso do glifosato nas culturas RR. Das espécies com resistência ao glifosato no Brasil, o capim-amargoso tem se mostrado a principal espécie desta problemática, devido à sua grande capacidade de sobreviver e multiplicar-se em ambientes distintos. O mapeamento histórico atual da dispersão de populações de capim-amargoso resistente ao glifosato, nas áreas de soja, é uma ferramenta de auxílio na determinação das razões que estejam ocasionando a expressão da resistência da planta daninha. Deste modo, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de contribuir no monitoramento da ocorrência e da dispersão de *Digitaria insularis* resistente ao glifosato nas principais regiões produtoras de soja do Brasil determinando a dose média que discrimina populações resistentes e suscetíveis através do método “base-line”; realizando o mapeamento da dispersão de populações de capim-amargoso resistentes ao glifosato, nas principais regiões produtoras de soja do Brasil; além de testar a hipótese de que a resistência de *D. insularis* ao glifosato pode ter sido dispersa pelo Brasil a partir de uma origem em comum. Comparando-se os biótipos suscetíveis de *D. insularis* com os padrões da literatura científica internacional e as médias de bulas, pôde-se concluir que a “base-line” de suscetibilidade entre as populações de é de 960 g e.a. ha⁻¹ glifosato. Este trabalho também demonstrou que a resistência de capim-amargoso ao glifosato está presente em todas as regiões produtoras de soja avaliadas, com frequência de 22,5% do total das amostras. Além de mostrar que estruturação genética dessas populações de capim-amargoso, mostrou-se baixa, evidenciando um fluxo gênico marcante do Sul para o Norte do Brasil, acompanhando a rota de maquinários ligadas a cultura da soja RR. Um forte processo de seleção associado ao uso do herbicida glifosato e do manejo da cultura da soja como um todo, está em curso estruturando as populações. E que as populações coletadas em Balsas-MA, Lucas do Rio Verde-MT, Sapezal-MT e Santa Rita do Trivelato-MT foram selecionadas localmente ou sob biótipo de pouca correlação genética com o Sul do Brasil. Os demais biótipos guardam estruturação genética suficiente para alegação de que fluíram, ao menos parcialmente, do Paraguai para áreas no Brasil.

Palavras-chave: Capim-amargoso, Glifosato, Base-line, Dinâmica populacional

ABSTRACT

Monitoring resistance to EPSPs-inhibiting herbicides and population genomics of *Digitaria insularis* in the main soybean producing regions in Brazil

The expansion of agricultural areas in the Brazilian Midwest with glyphosate-resistant crops (RR crops), mainly soybeans and corn, has contributed to the selection of weed-resistant biotypes. This is due to the high selection pressure caused by the use of glyphosate in RR cultures. Among the glyphosate-resistant species in Brazil, sourgrass has shown to be the main one with such problem, due to its great ability to survive and multiply in different environments. The current historical mapping of the dispersion of glyphosate-resistant sourgrass populations in soybean areas is an aiding tool in determining the reasons which are causing the expression of weed resistance. Thus, this paper has been developed aiming to contribute to the monitoring of the occurrence and dispersion of cases of glyphosate-resistant *Digitaria insularis* in the main soybean producing regions of Brazil, determining the average dose which discriminates resistant and susceptible populations through the “baseline method”; mapping the dispersion of glyphosate-resistant grass populations in the main soybean producing regions of Brazil; in addition to testing the hypothesis that the resistance of *D. insularis* to glyphosate may have been spread throughout Brazil from a common source. Comparing the susceptible biotypes of *D. insularis* to the standards of the international scientific literature and the averages of leaflets, it has been possible to conclude that the “baseline” of susceptibility among the populations of sourgrass is 960 g e.a. ha⁻¹ glyphosate. This research has also demonstrated that the resistance of sourgrass to glyphosate in Brazil is present in all the evaluated soybean producing regions, with a frequency of 22.5% of the total samples evaluated, in addition to showing that the genetic structure of such populations of sourgrass, obtained by sequencing via the GBS library, proved to be low, showing a marked gene flow from the South to the North of Brazil, following the route of machinery linked to the cultivation of RR soybean. A strong selection process associated with the use of the glyphosate herbicide and the management of the soybean culture as a whole, is in course by structuring the populations, and that the populations collected in Balsas-MA, Lucas do Rio Verde-MT, Sapezal-MT and Santa Rita do Trivelato-MT have been locally selected or under biotypes with little genetic correlation with Southern Brazil. The other biotypes keep genetic structure enough to claim that they have flowed, at least partially, from Paraguay to areas in Brazil.

Keywords: Sourgrass, Glyphosate, Baseline, Population dynamics

1 INTRODUÇÃO

A seleção de biótipos de plantas daninhas resistentes a herbicidas na agricultura brasileira e mundial é um fenômeno já constatado e relatado para praticamente todos os herbicidas em uso na agricultura. O mapeamento dos casos de resistência é importante para mensurar a amplitude do problema, além de, verificar o quão disseminado este problema está.

A resistência é a capacidade inerente e herdável de alguns biótipos, dentro de uma determinada população, de sobreviver e se reproduzir após a exposição à dose de um herbicida, que normalmente seria letal a uma população normal (suscetível) da mesma espécie (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2008). Trata-se de um fenômeno natural que ocorre espontaneamente nas populações, não sendo, portanto, o herbicida o agente causador, mas sim selecionador dos indivíduos resistentes que se encontram em baixa frequência inicial (CHRISTOFFOLETI; VICTORIA FILHO; SILVA, 1994; LÓPEZ-OVEJERO et al., 2006a).

A pressão de seleção exercida pelas aplicações de um mesmo herbicida tem levado ao aumento dos relatos de plantas daninhas resistentes a diversos herbicidas. É importante ressaltar que a resistência não é induzida pelos herbicidas, mas ocorre naturalmente devido a seleção de indivíduos em populações com variabilidade genética. A extensão das áreas agrícolas detectadas com a presença de biótipos de plantas daninhas resistentes pode ser considerada de pequena escala quando comparada com a área agrícola total, mas tem aumentado em taxa elevada (LÓPEZ-OVEJERO et al., 2006b).

Atualmente, no Brasil, existem 51 relatos de biótipos de plantas daninhas que apresentam resistência a um ou mais mecanismos de ação de herbicidas (HEAP, 2020). Além desses relatos de resistência, existem inúmeras outros biótipos que até o momento não foram identificadas com resistência, sobretudo apresentam alta tolerância a determinados tratamentos herbicidas.

O mapeamento da ocorrência de resistência pode auxiliar na determinação da gravidade do problema e na identificação de características climáticas ou de manejo em comum que estejam ocasionando a expressão da resistência ou apressando o processo de seleção do biótipo resistente (ANDRES et al., 2007). Além disso, o mapeamento pode mostrar se a resistência se desenvolveu isoladamente ou foi disseminada de algumas regiões para as demais.

Alguns trabalhos presentes na literatura referem-se ao mapeamento da resistência de plantas daninhas como *Bidens pilosa* (HERNANDES et al., 2005), *Euphorbia heterophylla* (VIDAL et al., 2004) aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) no sul do Brasil e *Digitaria insularis* ao herbicida glifosate (LÓPEZ-OVEJERO et al., 2017). Esses autores concluíram que a resistência se desenvolveu independentemente, sobretudo pela

ausência de práticas de manejo ou rotação de princípios ativos como forma de retardar o aparecimento de resistência e a necessidade dos produtores em adotar um sistema de manejo pró-ativo.

Deste modo este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de contribuir no monitoramento da ocorrência e da dispersão de casos de *Digitaria insularis* resistente ao glifosato nas principais regiões produtoras de soja do Brasil determinando a dose média que discrimina populações resistentes e suscetíveis através do método “base-line”; realizando o mapeamento da dispersão de populações de capim-amargoso resistentes ao glifosato, nas principais regiões produtoras de soja do Brasil; além de testar a hipótese de que a resistência de *D. insularis* ao glifosato pode ter sido dispersa pelo Brasil a partir de uma origem em comum.

Referências

ANDRES, A.; CONCENÇO, G.; MELO, P.T.B.S.; SCHMIDT, M.; RESENDE, R.G. Detecção da resistência de capim-arroz (*Echinochloa* sp.) ao herbicida quinclorac em regiões orizícolas do sul do Brasil. **Planta Daninha**, v.25, n.1, p.221-226, 2007.

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 da resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3.ed. Piracicaba: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas aos Herbicidas - HRAC-BR, 2008. p. 9-34.

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

HEAP, I. **International survey of resistant weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/in.asp>>. Acesso em: 07 fevereiro 2020.

HERNANDES, G.C.; VIDAL, R.A.; WINKLER, L.M. Levantamento de práticas agronômicas e distribuição geográfica de *Bidens* spp. resistentes aos herbicidas inibidores de ALS nos Estados do Rio Grande do Sul e do Paraná. **Planta Daninha**, v.23, n.4, p.677-682, 2005.

LÓPEZ-OVEJERO, R. F.; TAKANO, H. K.; NICOLAI, M.; FERREIRA, A.; MELO, M. S. C.; CAVENAGHI, A.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; OLIVEIRA JUNIOR, R. S. Frequency and Dispersal of glifosato-resistant sourgrass (*Digitaria insularis*) populations across brazilian agricultural production areas. **Weed Science**, v. 65, n. 2, p. 285-294, 2017.

LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CARVALHO, S.J.P.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Suscetibilidade comparativa de herbicidas pós-emergentes de biótipos de *Digitaria ciliaris* resistente e suscetível aos inibidores da ACCase. **Planta Daninha**, v.24, n.4, p.789-796, 2006a.

LÓPEZ-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**, v.24, n.2, p.399-406, 2006b.

VIDAL, R.A.; WINKLER, L.M.; HERNANDES, G.C.; FLECK, N.G.; MEROTTO JR., A.; TREZZI, M.M. A field survey of crop management practices and distribution of ALS resistant *Euphorbia heterophylla* in two states in southern Brazil. **Planta Daninha**, v.22, n.3, p.403-410, 2004.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plantas daninhas

Dentre os conceitos a respeito do que é uma planta daninha, alguns autores conceituam como sendo, simplesmente, “...planta que ocorre em local e momento indesejado, interferindo negativamente no cultivo” (ZILLER, 2001).

Outros autores conceituam, ecologicamente, plantas daninhas como sendo “...plantas com características pioneiras, ou seja, plantas que ocupam locais onde por qualquer motivo, a cobertura natural foi extinta e o solo tornou-se total ou parcialmente exposto” (PITELLI, 1987) ou “...espécies oportunistas (espontâneas) que ocorrem em ambientes com distúrbio humano” (PRITCHARD, 1960). Há, ainda, conceitos como “...planta sem valor econômico ou que compete, com o homem, pelo solo” (CRUZ, 1979); “...plantas cujas vantagens ainda não foram descobertas” e “...plantas que interferem nos objetivos do homem em determinada situação” (FISCHER, 1973).

Existem três períodos de interferência das plantas daninhas que foram propostos por Pitelli e Durigan (1984): período anterior à interferência (PAI) é o período em que a cultura pode conviver com a comunidade infestante sem que sua produtividade seja afetada negativamente; período total de prevenção à interferência (PTPI), representado pelo período desde a emergência ou do plantio em que a cultura deve ser mantida livre da presença de plantas daninhas para que sua produtividade não seja reduzida; e período crítico de prevenção à interferência (PCPI) em que a presença das plantas daninhas interferem de maneira crítica na produtividade e após este período não afetarão mais. O estudo destes períodos determina o período em que efetivamente os métodos de controle devem atuar (KUYA et al., 2000).

As plantas daninhas possuem características de rusticidade que lhes conferem grande capacidade competitiva. Enquanto as culturas são conduzidas com melhoramentos genéticos, as plantas daninhas obtiveram naturalmente a capacidade de crescer em ambientes e condições adversas naturais (KISSMANN, 2004).

Dentre os fatores de interferência, a competição é a forma mais conhecida de interferência das plantas daninhas sobre as culturas, de forma que os recursos mais sujeitos à competição são nutrientes minerais essenciais, água, luz e espaço. Ainda, certas espécies interferem alelopaticamente sobre as plantas cultivadas, causando sérios prejuízos ao seu crescimento, seu desenvolvimento e sua produtividade (BRIGUENTI; OLIVEIRA, 2011).

Novas espécies são disseminadas pelo mundo por terem características ornamentais, forrageiras, medicinais e até mesmo como culturas. Onde posteriormente se adaptam ao novo habitat tornando-se infestantes em várias culturas. Vários casos de introdução de plantas com

finalidade de alimentação animal que se tornaram plantas daninhas de alta competitividade no Brasil. Espécies como *Urochloa decumbens*, *U. brizantha* e *Panicum maximum* são apenas alguns exemplos de forrageiras introduzidas a partir de meados de 1950 e que hoje são grandes problemas para a agricultura brasileira e principalmente pérea cana de açúcar (KISSMANN; GROTH, 1997).

Segundo Silva e Silva (2007), em um conceito mais amplo, uma planta só pode ser considerada daninha se estiver, direta ou indiretamente, prejudicando determinada atividade humana. Portanto, pode-se notar que qualquer planta, de qualquer espécie, pode ser considerada planta daninha se estiver ocorrendo em um local de atividade humana e se estiver afetando de maneira negativa, em algum momento ou durante todo o tempo, essa atividade.

No geral, planta daninha é um conceito antrópico, ou seja, definido pelo homem; assim considere-se que se a planta causa algum tipo de dano à cultura de interesse ou a alguma etapa do processo de produção a mesma está uma daninha.

2.2 Capim-amargoso (*Digitaria insularis*)

O capim-amargoso (*Digitaria insularis*) é uma espécie nativa das regiões tropicais e subtropicais do Continente Americano, é uma espécie encontrada desde o sul dos Estados Unidos até o norte das planícies dos Pampas, na Argentina. No Brasil, ocorre com grande intensidade nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste (KISSMANN; GROTH, 1997; MACHADO et al., 2008).

Planta da família Poaceae, possui porte herbáceo e ereto, perene, densamente entouceirada, rizomatosa, com colmos estriados, entre 50 – 100 cm de altura (LORENZI, 2006). Os colmos são cilíndricos e canaliculados, com entrenós longos, pouco ou nada ramificados, com até 1 cm de espessura na base. As folhas possuem bainhas longas e abertas, que envolvem quase todo o entrenó, com lígula membranácea. Lâmina linear lanceolada, anfiestomática, com até 40 cm de comprimento e 1 cm de largura, com esparsos pelos e margens finamente serrilhadas (KISSMANN; GROTH, 1997; MACHADO et al., 2008; MOREIRA; BRAGANÇA, 2010).

A inflorescência é do tipo panícula ramificada e terminal. As panículas são grandes (15 - 30 cm), alocadas sobre longas hastes. Cada panícula é constituída por numerosas espigas (20-50), compressas quando jovens e pendentes quando adultas (normalmente para o mesmo lado). As espigas possuem coloração branco-prateada, e são constituídas por numerosas espiguetas pareadas (uma pedicelada e outra subséssil), rodeadas por pelos sedosos (KISSMANN; GROTH, 1997; MOREIRA; BRAGANÇA, 2010).

A identificação da espécie em campo é feita facilmente reconhecendo as panículas pendentes e de coloração branco-prateada. O fruto do tipo cariopse é a principal unidade de dispersão, sendo facilmente carregado pelo vento a longas distâncias, possuindo elevado poder germinativo. Os rizomas são outra importante forma de dispersão, sobretudo quando fragmentados; estes são curtos e ramificados, com gemas tuberculadas e presença de grande quantidade de amido (KISSMANN; GROTH, 1997; MACHADO et al., 2008; MOREIRA; BRAGANÇA, 2010).

Quanto à germinação do capim-amargoso, nota-se nítida preferência da espécie pela condição de alternância de temperatura (noite-dia), com temperatura ótima da ordem de 35 °C. A ausência de luz não é um fator limitante à germinação, sobretudo quando em maiores temperaturas. Por outro lado, o percentual de germinação, bem como o índice de velocidade de germinação (IVG) são reduzidos em condição de escuro e temperatura constante (MONDO et al., 2010).

Temperaturas extremas, próximas de 45 °C, inibem completamente a germinação da espécie (PYON; WHITNEY; NISHIMOTO, 1977; MONDO et al., 2010; MENDONÇA et al., 2014). Por consequência, a germinação das sementes é mais intensa no período de primavera e verão. Ainda, as sementes do capim-amargoso têm maior facilidade de germinação e emergência quando posicionadas na camada superficial do solo, em até 3 cm de profundidade (PYON; WHITNEY; NISHIMOTO, 1977).

O capim-amargoso realiza fotossíntese pelo ciclo C4, com estrutura de Kranz e bainha simples, o que é extremamente favorável ao seu desenvolvimento em ambientes quentes e/ou com menor disponibilidade hídrica. Quanto ao crescimento da espécie, há significativo conflito nos resultados experimentais, evidenciando a influência da temperatura e fotoperíodo sobre a biologia da espécie (MACHADO et al., 2006; MELO, 2011; CARVALHO; BIANCO; BIANCO, 2013; MARQUES et al., 2014).

Em geral, o capim-amargoso possui crescimento inicial lento até os 50 dias após emergência (DAE), porém com grande potencial em formar densas touceiras que, sob condições favoráveis, podem acumular grande quantidade de matéria seca. Por outro lado, possui ecofisiologia típica de plantas tropicais, influenciada pelas estações do ano e condições de fotoperíodo. Quando germinadas na primavera, com fotoperíodo crescente, possui longo ciclo vegetativo, desenvolvimento lento e florescimento tardio (80-100 DAE), com grande acúmulo de matéria seca. Quando germinadas no final do verão, em condição de fotoperíodo decrescente, têm redução no ciclo vegetativo, menor acúmulo de massa seca e florescimento precoce.

Notadamente, há preferência da espécie por florescer entre novembro e dezembro, porém, comumente há florescimento visível durante todo o ano.

2.3 Interferência das plantas daninhas em sistemas de produção

A infestação das plantas daninhas nas culturas agrícolas pode interferir de forma altamente significativa no desenvolvimento e produtividade das culturas, portanto, sua infestação é um dos mais importantes fatores bióticos dentro de um agro ecossistema comercial. Sua importância é dependente do momento e situação de infestação, podendo inclusive ser considerada como uma planta útil, como no caso da formação de cobertura morta a partir das plantas daninhas em um terreno em pousio, cujas plantas daninhas, quando corretamente dessecadas são desejadas como cobertura do solo para evitar erosão (KISSMANN, 2004).

As razões da alta competitividade das plantas daninhas estão relacionadas com suas características de rusticidade, que lhes conferem grande capacidade competitiva. Enquanto as culturas são melhoradas geneticamente, visando produtividade e não rusticidade, sendo estas duas características normalmente opostas

Como consequência, a infestação de plantas daninhas nas áreas agrícolas está classificada dentre os fatores bióticos mais importantes que interferem negativamente no potencial produtivo das culturas. Os efeitos negativos causados pelas plantas daninhas se manifestam sobre a quantidade e a qualidade da produção agrícola, consequência da competição pelos recursos de crescimento disponíveis no ambiente de produção, da alelopatia, ou por serem agentes que hospedam pragas e doenças, permitindo a multiplicação destas (CARVALHO, 2006). Lorenzi (2006) estima que, no Brasil, as perdas ocasionadas às culturas agrícolas pela interferência das plantas daninhas estejam em torno de 20 a 30%.

Estudos sobre as características das espécies e o comportamento delas no ambiente são os principais objetivos dos estudos da biologia das plantas daninhas atualmente. Quando se analisa o volume de pesquisas relacionadas ao controle químico de plantas daninhas, percebem-se muitos trabalhos nessa área, e relativamente poucos em biologia. Entretanto, este segmento de estudo da Ciência das Plantas Daninhas está crescendo consideravelmente nos últimos anos. Esses estudos são importantes, pois incorporam novos conhecimentos dos aspectos relacionados à competição entre plantas daninhas e as culturas, determinando o melhor momento para aplicação dos métodos de controle e, principalmente, auxiliando no desenvolvimento de práticas para o manejo integrado das plantas daninhas (CAMPOS, 2011).

Segundo Fernández (1982), uma das maiores limitações que existe para a implantação de programas de manejo integrado de plantas daninhas é a carência de conhecimentos básicos

sobre a biologia e ecologia destas plantas. O manejo efetivo das plantas daninhas, por meio de um sistema de manejo integrado, deve estar baseado em conhecimentos sólidos sobre biologia, uma vez que o grau de interferência das plantas daninhas sobre as culturas está diretamente relacionado com características próprias da comunidade infestante (BLEASDALE, 1960).

Novas espécies são disseminadas frequentemente pelo mundo por terem características ornamentais, forrageiras, medicinais e até mesmo como culturas e, posteriormente, se adaptam ao novo habitat tornando-se infestantes com variável grau de agressividade (WILLIAMS, 1980). Inúmeros foram os casos de introdução de plantas com finalidade de alimentação animal que se tornaram plantas daninhas de alta competitividade. No mundo podem-se citar *Cynodon dactylon* e *Digitaria* spp. como espécies disseminadas com esta finalidade (ZIMDAHL, 1999). No Brasil, as espécies *Urochloa decumbens*, *U. brizantha* e *Panicum maximum* são alguns exemplos de forrageiras introduzidas a partir de meados de 1950 e que hoje são grandes problemas para a agricultura brasileira. Em geral, tratam-se de plantas originárias da África, com crescimento rápido, que produzem muitas sementes e infestam lavouras com alta densidade e competitividade (KISSMANN; GROTH, 1999).

Qualquer mudança no sistema produtivo promove, em maior ou menor grau, alterações nas condições microclimáticas. Essas alterações, por sua vez, poderão influenciar nas composições específicas das plantas daninhas, pois novos fatores de pressão seletiva passam a atuar de forma mais significativa no agro ecossistema.

2.4 Resistência de plantas daninhas aos herbicidas

A partir de 1996, técnicas de engenharia genética impulsionaram o surgimento de culturas geneticamente modificadas, tolerantes a glifosato, aumentando ainda mais a sua utilização no mundo (PADGETTE et al., 1996). O glifosato, que antes da introdução de culturas tolerantes, era aplicado, aproximadamente, uma vez no ano, na época de pré-semeadura das lavouras, após a introdução de culturas modificadas, passou a ser aplicado em frequência mais intensiva, elevando a pressão de seleção exercida pelo herbicida na seleção de plantas resistentes (MOREIRA; CHRISTOFFOLETI, 2008).

No Brasil, os primeiros casos confirmados de seleção de populações com ocorrência de biótipos de plantas daninhas resistentes a herbicidas ocorreram em áreas com aplicações sucessivas de herbicidas do grupo dos inibidores da acetolactato sintase (ALS) por meio de biótipos da planta daninha picão-preto (*Bidens pilosa*) (CHRISTOFFOLETI et al., 1996).

A aplicação repetitiva de um mesmo ingrediente ativo ou de produtos com o mesmo mecanismo de ação em culturas sucessivas provoca o desbalanceamento na frequência inicial

dos genes, de forma a selecionar os indivíduos resistentes. Segundo Maxwell e Mortimer (1994), considera-se determinada população resistente quando 30% dos seus indivíduos são resistentes.

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). O primeiro caso de capim-amargoso resistente a glifosato foi relatado em 2008, sendo identificados biótipos de capim-amargoso resistentes ao glifosato no sul do Brasil e no Paraguai (HEAP, 2020).

A herança da resistência de *D. insularis* ao herbicida glifosato ainda é desconhecida, mas a hipótese de Melo (2015) ao estudar a herança genética da resistência de *D. insularis*, é que a resistência a este herbicida pode ser poligênica pois não houve alteração na resposta ao glifosato após o cruzamento dos biótipos suscetível e resistente na progênie F1. A diversidade genética das populações de *D. insularis* também deve ser levada em consideração. A variabilidade genética das populações de plantas daninhas é afetada por inúmeros fatores evolutivos, como o sistema de produção, a interação da cultura com a planta daninha (fluxo gênico através da dispersão do pólen e da semente), a distribuição geográfica e a seleção natural (HUANGFU; SONG; QIANG, 2009).

Apesar de ser uma planta autógama, biótipos de capim-amargoso resistente e suscetível ao herbicida glifosato possuem diferenças em seu DNA em torno de 56,6%, caracterizando alta variação na sequência enzimática desta espécie (MARTINS, 2013), que pode ser explicada pelo fato do capim-amargoso ter também taxa de fecundação cruzada (FRAGA et al., 2016). Essa variabilidade genética pode implicar em diferenças morfológicas, fisiológicas e genéticas, podendo alterar significativamente sua capacidade de resistir a ação dos herbicidas.

Pesquisas sobre diversidade genética das plantas cultivadas têm sido desenvolvidas para espécies, variedades, cultivares e caracterização de biótipos, porém poucos estudos têm sido feitos com plantas daninhas (ROCHA et al., 2009). O conhecimento se a diversidade genética da planta daninha é a mesma entre populações diferentes – especialmente entre aquelas sujeitas à seleção ocasionada pelo uso repetitivo de herbicidas e outra sem histórico de aplicação – é necessário (HUANGFU; SONG; QIANG, 2009).

2.5 Monitoramento da resistência

Atualmente, no Brasil, existem 51 relatos de espécies de plantas daninhas que possuem resistência a um ou mais mecanismos de ação de herbicidas (HEAP, 2020). Além desses relatos

de resistência, existem inúmeras outras espécies que até o momento não foram identificadas com resistência, sobretudo apresentam alta tolerância a determinados tratamentos herbicidas.

O mapeamento da ocorrência de resistência pode auxiliar na determinação da gravidade do problema e auxiliar na identificação de características climáticas ou de manejo em comum que estejam ocasionando a expressão da resistência ou apressando o processo de seleção do biótipo resistente (ANDRES et al., 2007). Além disso, o mapeamento pode mostrar se a resistência se desenvolveu isoladamente ou foi disseminada de algumas regiões para as demais.

Alguns trabalhos presentes na literatura referem-se ao mapeamento da resistência de plantas daninhas como *Bidens pilosa* (HERNANDES et al., 2005), *Euphorbia heterophylla* (VIDAL et al., 2004) aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) no sul do Brasil e *Digitaria insularis* ao herbicida glifosate (LÓPEZ-OVEJERO et al., 2017). Esses autores concluíram que a resistência se desenvolveu independentemente, sobretudo pela ausência de práticas de manejo ou rotação de princípios ativos como forma de retardar o aparecimento de resistência e a necessidade dos produtores em adotar um sistema de manejo pró-ativo.

2.6 Diversidade genética em populações de plantas

O desenvolvimento e a manutenção da estrutura genética ocorrem devido às interações de um conjunto complexo de fatores evolucionários, como variações no conjunto gênico, organização destas variações dentro de genótipos, distribuição espacial dos genótipos, sistema de reprodução, dispersão das progênies, seleção, deriva, mutação, eventos casuais e processos de crescimento, mortalidade e reposição dos indivíduos que darão origem a futuras populações (HAMRICK, 1983; LOVELESS; HAMRICK, 1984).

A compreensão dos processos microevolutivos dentro das populações nativas tem prosperado graças aos estudos da organização da variabilidade ou estrutura genética de populações, com o intuito de melhorar estratégias de domesticação, manejo e conservação dessas espécies (CARTHEW, 1993). Assim sendo, para que se possa preservar uma espécie, deve-se conservar ao máximo a quantidade de seus recursos genéticos. De acordo com Moran e Hopper (1987), esses recursos incluem toda a variação herdável que ocorre dentro de todos os indivíduos de uma espécie. E para que se possa avaliá-los são necessárias informações da estrutura genética de suas populações, o que envolve medidas de diversidade genética entre e dentro das populações (BROWN; MORAN, 1981). Os estudos de variabilidade genética em populações naturais devem ser direcionados para a quantificação da variação existente e na

caracterização dos níveis de variabilidade das populações, devendo-se lembrar que, em espécies de plantas, os fatores que influenciam na distribuição da variabilidade genética incluem o tamanho efetivo da população, a distribuição geográfica da espécie, o modo de reprodução, o mecanismo de dispersão de sementes e o tipo de comunidade onde a espécie é frequente (HAMRICK, 1983).

Segundo Weir e Basten (1990), a frequência de heterozigotos é um importante indicador da diversidade genética, pois cada heterozigoto detém alelos diferentes e, portanto, representa melhor a variação existente. No entanto, a heterozigosidade esperada ou diversidade gênica conforme a metodologia de Nei (1973), é uma medida mais apropriada por apresentar a variação tanto em populações de espécies autógamias como alógamas.

A estimativa da frequência de um alelo particular em uma população, chamada de frequência gênica ou alélica, é considerada fundamental nos estudos evolutivos, pois a mudança genética de uma população pode ser avaliada pela mudança nas suas frequências gênicas (NEI, 1987).

Conforme Loveless e Hamrick (1984), as populações de plantas não são organizadas aleatoriamente em grupos de genótipos, mas são estruturadas no espaço e no tempo. Essa estrutura pode ser expressa entre plantas geograficamente distintas, dentro de um grupo local de plantas, ou mesmo na progênie dos indivíduos. Portanto, em situações em que há uma seleção diferenciada em estágios do ciclo de vida, podem ocorrer diferenças genéticas significantes entre classes de idade, refletindo numa alteração da estrutura genética no tempo. Em outra situação, a adaptação em um microambiente é uma característica comum de populações de plantas e sua existência pode levar a uma distribuição não aleatória de genótipos dentro de populações o que leva a uma alteração da estrutura no espaço.

A estrutura genética é o resultado da ação conjunta de forças evolutivas como a mutação, migração, seleção e deriva que operam dentro de um contexto histórico e biológico de cada espécie de planta. Essas forças violam as condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg. A mutação, migração e a seleção tendem a mudar, de maneira previsível, a frequência gênica tanto em quantidade como em direção. Essa estrutura pode se manifestar entre populações geograficamente distintas dentro de um grupo de plantas, ou mesmo nos indivíduos de uma progênie.

Em suma, a estrutura genética pode ser definida como sendo a distribuição não aleatória de alelos ou de genótipos no espaço e no tempo prescindindo dos processos meióticos que também podem afetar as frequências alélicas e genotípicas.

2.7 Fluxo gênico em espécies vegetais

O termo “fluxo gênico” é utilizado para todos os mecanismos que resultam em movimentos de genes dentro de uma população e de uma população para outra (SLATKIN, 1987). Dessa forma, enquanto os efeitos da seleção natural, mutação e deriva genética levam a diferenciação dentro e entre populações, o fluxo gênico atua no sentido contrário, homogeneizando a variação genética espacial dentro e entre populações, além de poder induzir nova variação (WRIGHT, 1949; HAMRICK; MURAWSKI; NASON, 1993). Portanto, o conhecimento sobre a dinâmica do fluxo gênico é essencial na compreensão do potencial evolutiva da espécie, fornecendo subsídios para a conservação e manejo.

As plantas dispersam seus genes durante dois estágios do seu ciclo de vida: antes da fertilização, pelo movimento de pólen, e após a fertilização e desenvolvimento do embrião, por meio da dispersão de sementes. Uma vez que o fluxo gênico via pólen e via semente são eventos independentes, espécies de plantas com dispersão de pólen efetiva de longo alcance, porém, como dispersão de semente localizada pode ter menos variação genética entre populações geograficamente separadas, o que desencadeia ocorrência de grupos de indivíduos aparentados (NASON; HAMRICK, 1997). O reconhecimento desses estágios de dispersão gênica é fundamental para se compreender a distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações de plantas (LEVIN, 1981), além de, fornecer bases para compreensão dos padrões demográficos e formação das comunidades vegetais (HARDY et al., 2006).

De acordo com Futuyma (1992), diferenças na estrutura da população são correspondentes aos diversos modelos de fluxo gênico, dentro os quais se destacam: a) modelo continente-ilha, que se baseia no movimento unidirecional de uma fonte efetivamente grande (continental) para uma menor e isolada (ilha) (WRIGHT, 1943); b) o modelo de ilhas em que uma população é subdividida em subpopulações (demes) separadas geograficamente e o fluxo gênico ocorre ao acaso entre as subpopulações e todas contribuem da mesma forma com o fluxo gênico (WRIGHT, 1931); c) o modelo “stepping stone” no qual a migração acontece por passos somente entre populações vizinhas (KIMURA; WEISS, 1964); d) o de isolamento por distância no qual o fluxo gênico ocorre com maior frequência entre indivíduos espacialmente mais próximos do que entre os mais distantes, levando a uma diferenciação entre grupos de indivíduos que estão espacialmente mais distantes na população (WRIGHT, 1943).

As estimativas de fluxo gênico em plantas podem ser obtidas de forma direta ou indireta. As medidas diretas referem-se ao fluxo gênico contemporâneo, enquanto as indiretas são baseadas na estrutura de populações e referem-se ao fluxo gênico histórico (LEVIN, 1981; ELLSTRAND, 1992; ZUCCHI, 2002). Os métodos diretos baseiam na observação da dispersão

de pólen ou semente, por meio da utilização de corantes e marcadores morfológicos. Os métodos indiretos baseiam-se na estrutura genética das populações, isto é, na distribuição da diversidade genética entre populações para obter a estimativa do número efetivo de migrantes pro geração, em uma escala de tempo evolucionária (SORK et al., 1999; MARTINS et al., 2006).

Referências

ANDRES, A.; CONCENÇO, G.; MELO, P.T.B.S.; SCHMIDT, M.; RESENDE, R.G. Detecção da resistência de capim-arroz (*Echinochloa* sp.) ao herbicida quinclorac em regiões orizícolas do sul do Brasil. **Planta Daninha**, v.25, n.1, p.221-226, 2007.

BLEASDALE, J.K.A. Studies on plant competition. In: HARPER, J.L. (Ed.). **The biology of weeds**. Oxford: Backwell Scientific, 1960. p. 133-142.

BRIGHENTI, A. M.; OLIVEIRA, M. F. Biologia de plantas daninhas. In: OLIVEIRA JR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. (Eds.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Ompax, 2011. p. 1-36.

BROWN, A.H.D.; MORAN, G.F. Isozymes and the genetic resources of forest trees. In: CONCKLE, M.T. **Isozymes of north american forest insects**. Berkeley:U.S. Department Agriculture, 1981. p. 1-10.

CAMPOS, L. H. F. **Aspectos da emergência, crescimento inicial e suscetibilidade a herbicidas utilizados em cana-de-açúcar de *Merremia cissoides* (Lam.) Hall. f., *Neonotonia wightii* (Am.) Lackey e *Stizolobium aterrimum* Piper & Tracy**. 2011. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

CARTHEW, S.M. Population genetic structure of *Banksia spinulosa*. **Heredity**, v.70, n.6, p.566-573, 1993.

CARVALHO, L.B.; BIANCO, M.S.; BIANCO, S. Accumulation of dry mass and macronutrients by sourgrass plants. **Planta Daninha**, v.31, n.4, p.785-792, 2013.

CARVALHO, S.J.P. **Características biológicas e suscetibilidade a herbicidas de cinco espécies de plantas daninhas do gênero *Amaranthus***. 2006. 96 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

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 de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 2 ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas Daninhas aos Herbicidas (HRAC-BR), 2004. p. 3-22.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; PONCHIO, J.A.R.; BERG, C.V.D.; VICTORIA FILHO, R. Imidazolinone resistant *Bidens pilosa* biotypes in the Brazilian soybean areas. In: MEETING OF THE WSSA, 1996, Norfolk. **Abstracts...** Champaign: WSSA, 1996. p. 10.

- CRUZ, L. S. P. **Herbicidas em cultura de algodão**. São Paulo: CATI, 1979. 23p.
- ELLSTRAND, N. C. Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics. *Oikos*, p. 77-86, 1992.
- FERNÁNDEZ, O.A. Manejo integrado de malezas. **Planta Daninha**, Piracicaba, v. 5, n. 2, p. 69-75, 1982.
- FISCHER, H.H. Conceito de ervas daninhas. In: RODRIGUES, J.J., WILLIAN, R.D. (Eds.) **Curso intensivo de controle químico de ervas daninhas**. Viçosa, MG: UFV, 1973. p.1-74.
- FRAGA, D.; SILVA, A.F.; GAZZIERO, D.; AGOSTINETTO, D.; KARAM, D.; VARGAS, L. Biologia e genética das plantas daninhas resistentes a herbicidas no Brasil. In: CHRISTOFFOLETI; NICOLAI (Coord.). **Aspectos da resistência de plantas daninhas a herbicida**. 4.ed. Piracicaba, HRAC-BR, 2016. p. 59-75.
- FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: SBG, 1992, 631 p.
- HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHNEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBRIDE, B.; THOMAS, L. (Ed.). **Genetics and conservation**. Menlo Park: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1983. P.335-348.
- HAMRICK, J.L.; MURAWSKI, D.A.; NASON, J.D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. **Plant Ecology**, v. 107, n. 1, p. 281-297, 1993.
- HARDY, O.J.; MAGGIA, L.; BANDO, E.; BREYNE, P.; CARON, H.; CHEVALLIER, M. H.; DOLIGEZ, A.; DUTECH, C.; KREMER, A.; LATOUCHE-HALLÉ, C. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 2, p. 559-571, 2006.
- HEAP, I. **International survey of herbicide resistant weeds**. Disponível em: <http://www.weedscience.org/In.asp>. Acesso em: 07 de fevereiro 2020.
- HERNANDES, G.C., VIDAL, R.A. AND WINKLER, L.M. Levantamento de práticas agronômicas e distribuição geográfica de *Bidens* spp. resistentes aos herbicidas inibidores de ALS nos Estados do Rio Grande do Sul e do Paraná. **Planta Daninha**, v.23, n.4, p.677-682, 2005.
- HUANGFU, C. H.; SONG, X. L.; QIANG, S. ISSR variation within and among wild Brassica juncea populations: implication for herbicide resistance evolution. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 56, n. 7, p. 913-924, 2009.
- KIMURA, M.; WEISS, G.H. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. **Genetics**, v. 49, n. 4, p. 561, 1964.
- KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira, 1997. p. 675-678.

KISSMANN, K.G. Herbicidas: passado, presente e futuro. In: VARGAS, L.; ROMAN, E.S. (Ed.). **Manual de manejo e controle de plantas daninhas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p. 11-12.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2.ed. São Bernardo do Campo: BASF, 1999. 978 p.

KUVA, M.A.; PITELLI, R.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; ALVES, P.L.C.A. Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar. I – Tiririca. **Planta Daninha**, v. 18, n. 2, p. 241-251, 2000.

LEVIN, D. A. Dispersal versus gene flow in plants. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.68, n.2, p. 233-253, 1981.

LÓPEZ-OVEJERO, R. F.; TAKANO, H. K.; NICOLAI, M.; FERREIRA, A.; MELO, M. S. C.; CAVENAGHI, A.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; OLIVEIRA JUNIOR, R. S. Frequency and dispersal of glifosato-resistant sourgrass (*Digitaria insularis*) populations across brazilian agricultural production areas. **Weed Science**, v. 65, n. 2, p. 285-294, 2017.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. 6. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006. 339 p.

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinantes of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.15, n.1, p.65-95, 1984.

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

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**, v.26, n.1, p.1-8, 2008.

MARQUES, B.S.; SILVA, A.P.P.; LIMA, R.S.O.; MACHADO, E.C.R.; GONÇALVES, M.F.; CARVALHO, S.J.P. Growth and development of sourgrass based on days or thermal units. **Planta Daninha**, v.32, n.3, p.483-490, 2014.

MARTINS, J. F. **Aspectos ecofisiológicos e genético de biótipos de *Digitaria insularis* resistente e suscetível ao glyphosate**. 2013, 73 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

MARTINS, K.; CHAVES, L. J.; BUSO, G. S. C.; KAGEYAMA, P. Y. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St. Hil.(Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics**, v. 7, n. 6, p. 957-969, 2006.

MAXWELL, B. D.; MORTIMER, A. M. Selection for herbicide resistance. In: POWLES, S. B.; HOLTUR, J. A. M. **Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry**. Boca Raton: Lewis, 1994. p. 1-26.

MELO, M. S. C. **Levantamento de ocorrência, alternativas de manejo, mecanismos de resistência e herança genética do capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao herbicida glyphosate**. 2015. 108 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

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. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

MENDONÇA, G.S.; MARTINS, C.C.; MARTINS, D.; COSTA, N.V. Ecophysiology of seed germination in *Digitaria insularis* ((L.) Fedde). **Revista Ciência Agronômica**, v.45, n.4, p.823-832, 2014.

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**, v.32, n.1, p.131-137, 2010.

MORAN, G.F.; HOPPER, S.D. Conservation of the genetic resources of rare and widespread eucalypts in remnant vegetation. In: SAUNDERS, D.A.; ARNOLD, G.W.; BURBRIDGE, A.A.; HOPKINS, A.J.M. (Ed.). **Nature conservation: The role of remnants of native vegetation**. Surrey: Beaty, 1987. 410p.

MOREIRA, H.J.C.; BRAGANÇA, H.B.N. **Manual de identificação de plantas infestantes: cultivos de verão**. Campinas: FMC, 2010. 642p.

MOREIRA, M. S.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da EPSPs (Grupo G). In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Coord.) **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3.ed. Piracicaba: HRAC-BR, 2008. p.78-96.

NASON, J.D.; HAMRICK, J.L. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of neotropical canopy trees. **Journal of Heredity**, v. 88, n. 4, p. 264-276, 1997.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.70, n.12, p.3321-3323, 1973.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512p.

PADGETTE, S. R.; RE, D. B.; BARRY, G. F.; EICHHOLTZ, D. E.; DELANAY, X.; FUCHS, R. L.; KISHOE, G. M.; FRALEY, R. T. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. In: DUKE, S. O. (Ed.) **Herbicide-resistant crops: agricultural, economic, environmental, regulatory and technological aspects**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1996. p.53-84.

PITELLI, R.A. Competição e controle das plantas daninhas em áreas agrícolas. Série Técnica IPEF, Piracicaba, v4, n.12, p.1, São Paulo, 1987. Disponível em: <<http://www.ipef.br/publicacoes/stecnica/nr12/cap01.pdf>>. Acesso em: 04 mar. 2020.

PITELLI, R.A.; DURIGAN, J.C. Terminologia para períodos de controle e de convivência de plantas daninhas em culturas anuais e bianuais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS, 15., 1984. Belo Horizonte, **Resumos...** Piracicaba, 1984. p. 37.

PRITCHARD, T. Race formation in weedy species with special reference to *Euphorbia cyparissias* L. and *Hypericum perforatum* L. In: HARPER, J.L. (Ed.). **The biology of weeds: a symposium of the British Ecological Society.** Oxford: Blackwell Science. 1960. p 61-66.

PYON, J.Y.; WHITNEY, A.S.; NISHIMOTO, R.K. Biology of sourgrass and its competition with buffelgrass and guineagrass. **Weed Science**, v.25, n.2, p.171-174, 1977.

ROCHA, D. C.; RODELLA, R.A.; MARINO, C.L.; MARTINS, D. Genetic variability among Commelina weed species from the states of Paraná and São Paulo, Brazil. **Planta Daninha**, v. 27, n. 3, p. 421-427, 2009.

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

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v. 236, n. 4803, p. 787, 1987.

SORK, V. L.; NASON, J.; CAMPBELL, D. R.; FERNANDEZ, J. F. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, n. 6, p. 219-224, 1999.

VIDAL, R.A.; WINKLER, L.M.; HERNANDES, G.C.; FLECK, N.G.; MEROTTO JR., A.; TREZZI, M.M. A field survey of crop management practices and distribution of ALS resistant *Euphorbia heterophylla* in two states in southern Brazil. **Planta Daninha**, v.22, n.3, p.403-410, 2004.

WEIR, B.S.; BASTEN, C.J. Sampling strategies for DNA sequence distance. **Biometrics**, v.26, n.1, p.551-582, 1990.

WILLIAMS, M.C. Porposefully introduced plants that have become noxious or poisonous weeds. **Weed Science**, v. 28, n. 3, p. 300-305, 1980.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, n. 2, p. 97, 1931.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v. 28, n. 2, p. 114, 1943.

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

ZILLER, S.R. Plantas exóticas invasoras: a ameaça da contaminação biológica. Instituto para o Desenvolvimento de Energias Alternativas e da Auto-sustentabilidade (Ideas) PR. **Ciência Hoje**, v.30, n.178, p.77-79, 2001.

ZIMDAHL, R.L. **Fundamentals of weed science.** Fort Collins: Academic Press, 1999. 556 p.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR.** 2002. 130 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade Federal de Viçosa, Piracicaba, 2002.

3 “BASE-LINE” DE SUSCETIBILIDADE DE POPULAÇÕES DE *Digitaria insularis* AO GLIFOSATO

Resumo

A frequente aplicação sequencial de glifosato, especialmente em culturas com cultivares resistentes ao herbicida, gerou pressão de seleção sobre algumas populações de capim-amargoso (*Digitaria insularis*), selecionando populações resistentes ao herbicida nos sistemas de produção de grãos, assim como em sistemas com culturas perenes. No entanto, a pesquisa não tem determinado, ao longo deste processo de seleção, o nível real de suscetibilidade das populações que não sofreram este processo seletivo, ou seja, uma certa dose de glifosato que poderia ser utilizada para discriminar uma população resistente de uma suscetível. Sendo assim, esta pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de determinar a dose média que discrimina populações resistentes e suscetíveis de capim-amargoso ao glifosato, através do método “base-line”. Esta determinação pode ser uma forma adequada para a detecção, com segurança científica, da existência da resistência de uma população de capim-amargoso ao glifosato. O experimento foi dividido em duas etapas, sendo na primeira feita a identificação e discriminação entre as populações suscetíveis e resistentes ao glifosato e, na segunda, a construção da “base-line” de populações suscetíveis ao herbicida glifosato. Após a comparação das populações suscetíveis de capim-amargoso, bem como com os padrões da literatura científica, e as médias de doses recomendadas pelos órgãos regulatórios do Brasil, concluiu-se, a partir da “base-line” de suscetibilidade entre as populações de capim-amargoso, que a dose de 960 g e.a. ha⁻¹ de glifosato deve ser utilizada em futuras pesquisas para determinar se um biótipo de capim-amargoso é resistente ao glifosato.

Palavras chave: Dose discriminatória, Capim-amargoso, Resistência a herbicidas

3 SUSTAINABILITY "BASE-LINE" OF *Digitaria insularis* TO THE GLYPHOSATE

Abstract

Frequent and sequential application of glyphosate, chiefly in crops with herbicide-resistant cultivars, has imposed some selection pressure to populations of sourgrass (*Digitaria insularis*), selecting herbicide-resistant populations in grain production systems, as well as in systems with perennial crops. However, research has not been able to determine, during the selection process, the real level of susceptibility of populations that have not undergone such process, which is the rate of glyphosate that could be used in order to discriminate a resistant population from a susceptible one. Thus, the objective of this research has been to determine the average rate, which discriminates, resistant from susceptible populations of sourgrass to glyphosate, through the "baseline" method. Such determination may be an adequate way to detect, with scientific security, the existence of glyphosate resistance in a population of sourgrass. The experiment has been divided into two steps, the first one, being the identification and discrimination between the populations which are susceptible and resistant glyphosate and, in the second one, the “baseline” of biotypes susceptible to the glyphosate herbicide has been built. After the comparison to the susceptible populations of sourgrass, as well as to the standards of the international scientific literature, and the average rates recommended by the Brazilian regulatory governmental institutions, it has been concluded, based on the “baseline” of susceptibility among the populations of sourgrass, that the rate of 960 g a.e. ha⁻¹ of glyphosate

should be used in future researches in order to determine if a population of sourgrass is resistant to glyphosate.

Keywords: Discriminatory rate, Sourgrass, Herbicide resistance

3.1 Introdução

O glifosato é o herbicida mais importante utilizado globalmente em áreas de plantio direto, ou culturas perenes, por possuir amplo espectro de controle e baixo custo (GALLI; MONTEZUMA, 2005; DUKE; POWLES, 2008). Todavia, sua intensa utilização resulta em 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 glifosato é usado intensivamente (HEAP, 2020).

A resistência de plantas daninhas ao glifosato 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 tiveram cinética enzimática indesejável (BRADSHAW et al., 1997). O não surgimento de resistência ao glifosato parecia ser verdadeiro por não ter sido encontrada durante os primeiros 15 anos de uso como herbicida não seletivo. No entanto, a utilização intensiva de glifosato especialmente após a introdução de plantas transgênicas resistentes, impôs alta pressão de seleção sobre as plantas daninhas, resultando na evolução da resistência ao glifosato em populações de nove espécies até o momento (HEAP, 2020).

Apesar do número de espécies resistentes 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 glifosato (DUKE; POWLES, 2008). A frequente utilização de glifosato ao longo dos anos gerou grande pressão de seleção sobre populações de *Digitaria insularis* presentes em áreas agrícolas dos Estados brasileiros 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 dificuldade de controle com glifosato em plantas de *D. insularis*, após a perenização, seja devido a resistência ao herbicida, em função da existência de populações com diferentes níveis de suscetibilidade (CORREIA; LEITE; GARCIA, 2010) e do aumento crescente na dose de glifosato necessária para 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). Experimentos em campo e casa-de-vegetação, 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.

O herbicida glifosato possui grande variação em sua recomendação em função do estágio de desenvolvimento e espécie de planta daninha a ser estudada (RODRIGUES; ALMEIDA, 2018). Assim, a aplicação de uma dose recomendada, chamada aqui de “base-line”, em um determinado estágio de desenvolvimento da planta daninha alvo é uma alternativa para indicação da existência da resistência ao comparar as avaliações com plantas oriundas de uma população suscetível já conhecida.

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 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; GIBSON; JOHNSON, 2008).

Sendo assim, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de elaborar a “base-line” do capim-amargoso, gerando assim a dose discriminatória de distinção entre populações suscetíveis e resistentes de *D. insularis* ao herbicida glifosato, por meio de curvas de dose-resposta.

3.2 Material e métodos

Todo o trabalho foi desenvolvido em casa-de-vegetação do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP, no município de Piracicaba, São Paulo (22° 42’S; 47° 37’ W; 545 m de altitude) e dividiu-se em duas etapas. A primeira etapa constituiu-se da identificação e separação de biótipos suscetíveis dos resistentes. Na segunda etapa, elaborou-se efetivamente a “base-line” dos biótipos suscetíveis ao herbicida glifosato.

Identificação de biótipos suscetíveis e resistentes

No momento da coleta, foram anotadas as coordenadas geográficas dos pontos amostrais (Tabela 3.1). No total, foram avaliadas trinta populações de capim-amargoso, provenientes de propriedades produtoras de soja localizadas nos estados de GO, MG, MT e PR (Figura 1). Em

cada área, foram coletadas sementes de, no mínimo, 20 plantas por população, em estágio de plena maturidade fisiológica.

Tabela 3.1. Amostras de populações de capim-amargoso, estado de coleta e coordenadas geográficas. Piracicaba - SP, 2020.

Estado	Coordenadas Geográficas	
	Latitude	Longitude
GO	-17,78278	-50,96056
GO	-17,80556	-50,90278
GO	-17,31278	-50,51139
GO	-17,32028	-50,56889
GO	-17,31139	-50,60750
GO	-17,28167	-50,61056
GO	-17,29694	-50,66806
GO	-17,27250	-50,61139
MG	-18,17750	-49,88389
MG	-18,28222	-49,61278
MG	-17,48250	-49,41194
MT	-13,82778	-59,09417
MT	-15,06917	-53,65778
MT	-16,38583	-55,16472
MT	-13,68111	-55,52889
MT	-14,06250	-56,49250
MT	-12,02028	-55,69667
MT	-14,03389	-58,00333
MT	-11,61278	-55,48111
MT	-11,98306	-55,95361
MT	-13,20583	-55,27222
MT	-11,91694	-55,49833
MT	-12,33222	-55,98806
MT	-13,85556	-56,74861
MT	-13,02972	-56,06444
MT	-13,34250	-56,44556
MT	-14,05639	-52,36778
MT	-13,22278	-51,94944
PR	-24,60722	-53,40667
PR	-23,15694	-50,34278



Figura 3.1. Distribuição de biótipos selecionados para identificação de suscetibilidade e resistência ao herbicida glifosato. Piracicaba - SP, 2020.

Para instalação do experimento, as sementes foram distribuídas em excesso em caixas plásticas de 2,0 L, preenchidas com proporção de substrato comercial (casca de *Pinus*, turfa e vermiculita) e vermiculita (3:1; v:v). No início do perfilhamento, as plântulas foram transplantadas para vasos de 1L, preenchidos com a mesma mistura de substrato, onde permaneceram até o término do experimento, em densidade média de três plantas por vaso, sem deficiência hídrica.

A suscetibilidade das populações foi quantificada por meio de curvas de dose-resposta. Os tratamentos foram organizados em blocos casualizados, com 6 tratamentos e 4 repetições, em que as doses do herbicida foram: 8D, 4D, D, 1/4D, 1/8D e testemunha sem aplicação. Na qual, para D foi considerada a dose de 960 g e.a. ha⁻¹.

As pulverizações foram realizadas sobre plantas em estágio de 2 a 3 perfilhos. Para tanto, foi utilizado pulverizador costal de precisão, pressurizado por CO₂, acoplado a barra com duas pontas do tipo TeeJet 110.02, posicionada a 0,50 m dos alvos, com consumo relativo de calda de 200 L ha⁻¹.

Foi avaliado o controle percentual e massa seca residual aos 28 dias após aplicação (DAA). Para a avaliação de controle, foi atribuído 0% no caso da ausência de sintomas causados

pelo herbicida e 100% para a morte das plantas. A massa vegetal foi obtida a partir da colheita do material remanescente nas parcelas, com posterior secagem em estufa a 70 °C por 72 horas. A massa seca foi corrigida para valores percentuais por meio da comparação da massa obtida nos tratamentos herbicidas com a massa da testemunha, considerada 100%.

A análise dos dados foi realizada por meio da aplicação do teste F na análise da variância. As curvas de dose-resposta foram ajustadas ao modelo de regressão não-linear do tipo logístico. A variável controle foi ajustada ao modelo proposto por Streibig et al. (1988);

$$y = \frac{a}{\left[1 + \left(\frac{x}{b}\right)^c\right]}$$

Em que: y = porcentagem de controle; x = dose do herbicida; e a , b e c = parâmetros da curva, de modo que a é a diferença entre o ponto máximo e mínimo da curva, b é a dose que proporciona 50% de resposta da variável e c é a declividade da curva.

Para as variáveis massa fresca e seca residual, foi adotado o modelo proposto por Seefeldt, Jensen e Fuerst (1995);

$$y = P_{\min} + \frac{a}{\left[1 + \left(\frac{x}{b}\right)^c\right]}$$

Em que: y é o controle percentual ou a massa seca residual, x é a dose do herbicida (g ha^{-1}), P_{\min} é o ponto mínimo da curva; e a , b , e c são parâmetros estimados da equação, de tal forma que a é a amplitude existente entre o ponto máximo e o ponto mínimo da variável; b é a dose que proporciona 50% de resposta da variável e c é a declividade da curva ao redor de b .

O modelo logístico possui vantagens uma vez que um dos termos integrantes da equação é uma estimativa do valor de C_{50} ou de GR_{50} (CHRISTOFFOLETI, 2002). O C_{50} (control by 50%) e o GR_{50} (growth reduction by 50%) são as doses do herbicida que proporcionam 50% de controle ou de redução de massa da planta daninha, respectivamente (CHRISTOFFOLETI, 2002; CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2008). Embora um dos parâmetros do modelo logístico seja uma estimativa do valor de C_{50} , também foi realizado seu cálculo matemático por meio da equação inversa, conforme discussão proposta por Carvalho et al. (2005).

Após as análises das curvas de dose-resposta, foi avaliado o padrão de resposta do C_{50} e GR_{50} acumulado das populações, visando separar indivíduos resistentes e suscetíveis através destes parâmetros para elaboração da “base-line” de suscetibilidade.

Visando validar as discussões, realizou-se também revisão bibliográfica de trabalhos que quantificaram valores de DL₅₀ ou GR₅₀ de biótipos reconhecidamente suscetíveis ao herbicida glifosato.

Elaboração de “base-line” de suscetibilidade de *D. insularis* ao herbicida glifosato

Nesta etapa, utilizaram-se somente os indivíduos considerados suscetíveis ao herbicida glifosato na etapa anterior. A suscetibilidade das populações foi quantificada por meio de curvas de dose-resposta conforme metodologia descrita na primeira etapa dos experimentos.

Após as análises das curvas de dose-resposta, foi avaliado o padrão de resposta do C₈₀ e GR₈₀ acumulado das populações, além do intervalo de confiança das mesmas. Realizou-se também levantamento de bulas de formulações comerciais de glifosato registradas no Brasil para comparação. Os padrões de C₈₀ e GR₈₀ foram considerados pelo fato de que serem os valores mínimos exigidos na legislação em vigor (CARVALHO et al., 2005).

3.3 Resultados e discussão

Identificação de biótipos suscetíveis e resistentes

Após as análises de suscetibilidade dos 30 indivíduos oriundos dos estados de Goiás, Mato Grosso e Paraná, identificaram-se 14 populações suscetíveis com médias de C₅₀ de 447,33 e GR₅₀ de 486,76 g e.a. ha⁻¹ enquanto que as 16 outras populações foram consideradas resistentes, obtendo médias de C₅₀ de 1605,05 e GR₅₀ de 1504,98 g e.a. ha⁻¹, alcançando um fator de resistência médio de 3,58 para controle e 3,09 para massa (Tabelas 3.2 e 3.3).

Com relação a revisão bibliográfica realizada, referente as populações suscetíveis (Tabela 3.4), foram encontrados valores variáveis entre 219,74 e 691,00 g e.a. ha⁻¹ para C₅₀ e 189,72 e 497,60 g e.a. ha⁻¹ para GR₅₀, com média geral calculada em 395,22 e 342,95 g e.a. ha⁻¹ para C₅₀ e GR₅₀ respectivamente.

Tabela 3.2. Variáveis avaliadas, parâmetros do modelo logístico¹, coeficiente de determinação (R²) e controle (C) para a suscetibilidade de biótipos de *D. insularis* ao herbicida glifosato. Piracicaba - SP, 2020.

Biótipo	Parâmetros para controle			R ²	C ₅₀
	a	b	c		
1	99,312	264,576	-5,119	0,999	265,293
2	99,163	340,559	-1,556	0,998	344,276
3	100,141	389,275	-2,036	1,000	388,736
4	102,711	405,173	-1,648	0,977	392,399
5	102,407	436,427	-1,904	0,977	425,780
6	101,390	433,041	-2,537	0,994	428,384
7	99,990	454,931	-1,922	0,996	454,980
8	100,110	466,645	-2,708	0,995	466,266
9	101,499	482,228	-1,697	0,995	473,910
10	101,876	498,128	-1,779	0,995	487,924
11	99,881	505,204	-3,460	0,994	505,552
12	102,106	520,404	-2,184	0,982	510,665
13	102,603	552,691	-1,696	0,991	536,400
14	100,431	583,593	-3,381	0,989	582,112
15	105,486	1125,886	-1,348	0,988	1042,227
16	103,810	1127,821	-1,251	0,998	1063,528
17	109,511	1321,738	-0,978	0,997	1106,084
18	102,303	1148,426	-1,870	0,995	1121,108
19	104,535	1268,268	-1,416	0,991	1192,814
20	100,928	1233,104	-1,886	0,998	1221,137
21	111,520	1538,858	-0,940	0,994	1234,131
22	104,526	1435,546	-1,050	0,998	1321,799
23	101,101	1336,996	-1,932	0,999	1322,015
24	101,151	1425,584	-1,904	0,997	1408,648
25	107,742	1940,374	-1,286	0,997	1734,926
26	115,406	2738,982	-0,861	0,983	2004,739
27	100,444	2275,451	-2,019	0,998	2265,504
28	107,623	2630,095	-1,520	0,993	2395,661
29	103,967	2541,170	-1,355	0,999	2401,925
30	108,972	3290,100	-1,134	0,996	2844,511

¹Modelo matemático: $y = a/(1+(x/b)^c)$

Tabela 3.3. Variáveis avaliadas, parâmetros do modelo logístico¹, coeficiente de determinação (R²) e redução de crescimento (GR) para a suscetibilidade de biótipos de *D. insularis* ao herbicida glifosato. Piracicaba - SP, 2020.

Biótipo	Parâmetros para massa seca residual				R ²	GR ₅₀
	P _{mín}	a	b	c		
1	-0,194	100,178	276,801	2,885	1,000	276,399
2	0,651	99,789	352,407	1,644	0,996	357,131
3	-1,149	100,474	408,148	1,884	0,997	400,359
4	-1,118	100,499	474,662	2,053	0,999	466,734
5	-1,685	98,882	505,083	2,085	0,987	483,546
6	-0,005	99,344	486,749	2,177	0,997	483,758
7	-1,890	99,625	510,436	1,878	0,989	488,241
8	-2,152	101,134	513,608	1,727	0,995	495,292
9	-1,572	96,349	529,157	2,655	0,983	501,728
10	0,143	97,320	523,772	3,019	0,996	515,310
11	-0,690	99,036	553,370	2,276	0,997	541,973
12	-2,622	101,220	613,421	1,176	0,991	573,293
13	-0,743	99,379	611,483	2,545	0,999	601,377
14	-0,662	100,225	635,913	2,179	1,000	629,544
15	-4,729	103,746	1147,488	1,331	0,996	1056,303
16	-3,267	100,450	1171,152	1,439	0,991	1076,456
17	-1,272	99,653	1144,790	2,083	0,999	1113,346
18	-2,750	103,476	1178,856	1,532	0,983	1149,131
19	-5,558	106,501	1268,680	1,172	0,997	1178,140
20	-3,586	104,298	1250,224	1,070	0,997	1187,443
21	-3,330	103,622	1257,752	1,101	0,999	1192,495
22	0,112	98,650	1246,337	2,251	0,999	1233,764
23	-4,325	103,577	1364,062	1,472	0,995	1276,222
24	-3,936	104,795	1332,098	1,398	0,998	1277,290
25	-5,395	105,915	1814,606	1,083	0,993	1666,601
26	-2,373	101,990	1798,209	1,401	0,999	1730,153
27	-0,211	97,320	2027,357	2,270	0,997	1971,201
28	-6,423	106,726	2349,026	1,100	0,994	2116,290
29	-4,162	104,433	2396,542	1,909	0,997	2304,795
30	-5,432	102,732	2881,148	1,300	0,997	2550,089

¹Modelo matemático: $y = P_{mín} + a/(1+(x/b)^c)$

Tabela 3.4. Nível de suscetibilidade ao herbicida glifosato de populações de *D. insularis* disponível na literatura científica, estimada por curvas de dose-resposta. Piracicaba - SP, 2020.

Autores	Estádio de Aplicação	Avaliação DAA ²	Resultado ¹	
			C ₅₀	GR ₅₀
Canedo et al., 2019	Início perfilhamento	28	524,88	313,20
Cavaliere, 2017	Início perfilhamento	21	417,95	372,27
Silveira, 2017	3 a 4 folhas	21	243,70	431,60
Gonçalves Netto et al., 2015	Início perfilhamento	28	219,74	189,72
Melo, 2011	Início perfilhamento	28	274,04	253,31
Correia et al., 2010	Início Perfilhamento	28	691,00	497,60
Valor Médio Geral³			395,22	342,95

¹Resultado expresso em gramas de glifosato (equivalente ácido) necessários para obter 50% de controle da população (C₅₀) ou para obter 50% de redução na massa de matéria seca (GR₅₀); ²DAA – dias após aplicação;

³Valor médio entre as populações suscetíveis.

Observou-se também que mesmo quando comparados o indivíduo suscetível de maior C₅₀ ou GR₅₀ com o indivíduo resistente de menor C₅₀ ou GR₅₀, o fator de resistência se mantém alto, maior que 1,8, caracterizando resistência e possibilitando a separação entre as populações suscetíveis e resistentes, sendo que o limite de separação foi na faixa de 1000 g e.a. ha⁻¹ (Figura 3.2). Segundo Saari et al. (1994) a resistência é confirmada quando fator R/S > 1,0.

O fator de resistência varia em função do biótipo estudado, em função do tempo em que o processo de seleção de resistência está instalado na área, e da espécie de planta daninha avaliada (DUKE; POWLES, 2008). Para o capim-amargoso, os fatores de resistência encontrados em trabalhos similares, quando comparados aos fatores de resistência aos herbicidas inibidores da ALS, são considerados baixos, ficando entre 5,6 (CARVALHO, 2011) e 8,0 (CHRISTOFFOLETI et al., 2009).

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é resultante de processo evolucionário. Esta evolução ocorre em função da aplicação repetitiva de um determinado herbicida ou de herbicidas diferentes, mas que possuem o mesmo mecanismo de ação, mudando a composição genética das populações de plantas daninhas, aumentando a frequência dos alelos de resistência e consequentemente o número de indivíduos resistentes na população (CHRISTOFFERS, 1999). Uma das melhores citações encontradas que se refere ao processo de seleção de biótipos de plantas daninhas resistentes a herbicidas afirma: “A resistência de plantas a herbicidas é a evolução em ação” (THARAYIL-SANTHAKUMAR, 2002). A evolução ocorre sempre que a frequência de um gene dentro de uma população é alterada em consequência de seleção, mutação, migração ou distribuição aleatória (CHRISTOFFERS, 1999).

A variabilidade genética natural existente em qualquer população de plantas daninhas é a responsável pela fonte inicial de resistência em uma população suscetível. Geralmente, as mutações gênicas que ocorrem em uma população suscetível, que ainda não foi submetida a pressão de seleção pelo herbicida, são resultantes de variabilidade genética espontânea, não sendo, portanto, induzida pelo agente de seleção, ou seja, o herbicida.

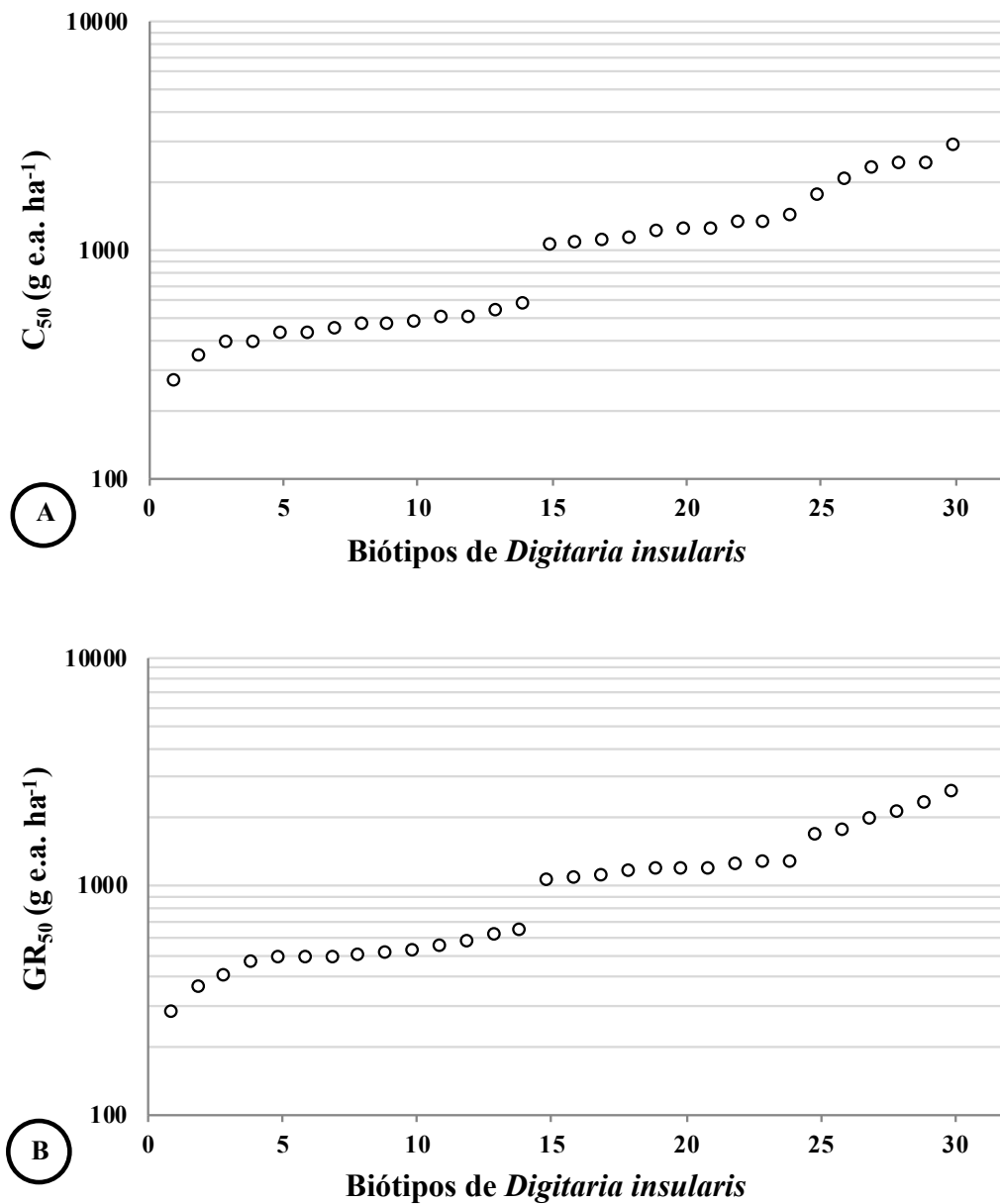


Figura 3.2. Dispersão para C₅₀ (A) e GR₅₀ (B) de diferentes biótipos de capim-amargoso após aplicação de diferentes doses do herbicida glifosato, avaliado aos 28 DAA. Piracicaba - SP, 2020

Elaboração de "base-line" de suscetibilidade de *D. insularis* ao herbicida glifosato

Os dados obtidos após a aplicação das doses de glifosato sobre as populações suscetíveis de capim-amargoso (*D. insularis*), selecionados no primeiro experimento, indicaram C_{80} de 857,39 g e.a. ha^{-1} ($\pm 81,85$) e GR_{80} de 941,16 g e.a. ha^{-1} ($\pm 127,35$) (Figura 3.3).

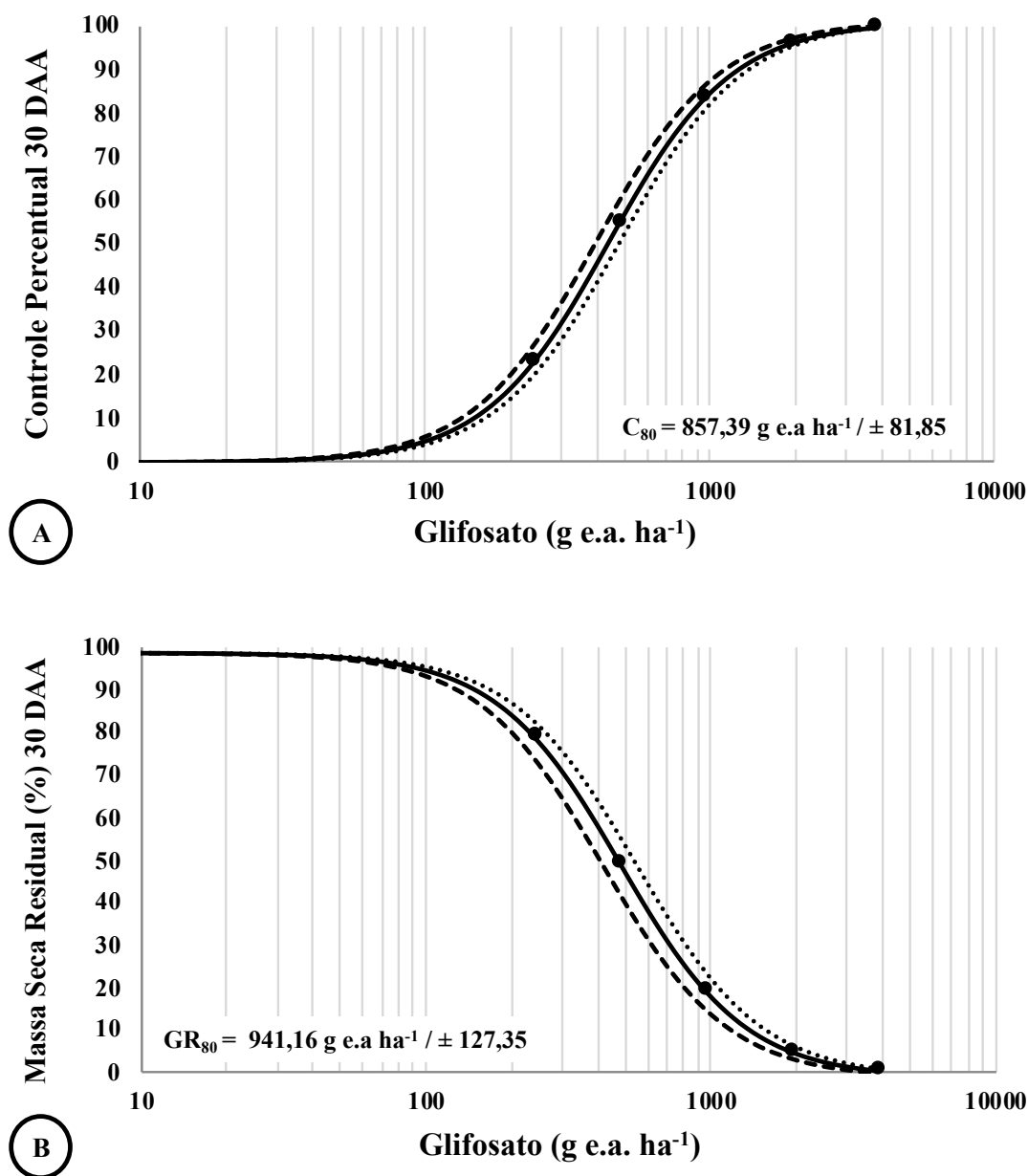


Figura 3.3. Controle percentual (A) e massa seca (B) residual de biótipos suscetíveis de *D. insularis*, submetidos a diferentes doses do herbicida glifosato, avaliados aos 30 dias após aplicação (DAA). Piracicaba - SP, 2020.

No levantamento de bulas das formulações comerciais de glifosato registradas no Brasil encontraram-se 62 produtos com recomendação de uso para controle de capim-amargoso, com

doses variando de 325 a 1.800 g e.a. ha⁻¹ (MAPA 2020; RODRIGUES; ALMEIDA, 2018). Considerando apenas as aplicações em pós-emergência na soja RR para fornecer controle eficiente de gramíneas com 2 a 3 perfilhos, a média das doses recomendadas é 876,23 g e.a. ha⁻¹ (Tabela 3.5).

O uso de modelos matemáticos do tipo logístico proporcionou perfeito ajuste do conjunto de dados, com coeficientes de determinação sempre superior a 99% (Tabela 3.6). Portanto, a dose discriminatória ("base-line") considerada ideal para controle das plantas suscetíveis foi a de 960 g e.a. ha⁻¹ de glifosato. Dose essa que, quando comparada a média de recomendações de bula de 880,00 g e.a. ha⁻¹ (Tabela 3.4), fica caracterizada como dose eficaz para o controle de biótipos suscetíveis e ineficaz para o controle de biótipos resistentes. Sendo esta também a dose suficiente para controle de plantas suscetíveis e níveis de controle abaixo de 80% das plantas resistentes em outros trabalhos (LAMEGO; VIDAL, 2008; SANTOS et al., 2014a; SANTOS et al., 2014b), o que suporta a utilização desta dose discriminatória.

A abordagem de utilização de dose discriminatória única usada para caracterizar o nível de resistência ao glifosato é amplamente descrita na literatura (OWEN; MARTINEZ; POWLES, 2015; ROSENBAUM; BRADLEY, 2013; SCHULTZ et al., 2015). A dose discriminatória é definida como a taxa mínima que fornece a diferença máxima entre curvas dose-resposta para biótipos resistentes (R) e suscetíveis (S), resultando em um controle mínimo de 80% do biótipo S (BECKIE et al. 1990; BOURGEOIS; MORRISON 1997; NORSWORTHY; TALBERT; HOAGLAND, 1998).

Em observações a campo, em áreas onde há uso contínuo de glifosato, tem-se constatado que plantas originárias de sementes, quando jovens, são controladas pelo herbicida; contudo, quando elas se desenvolvem e formam rizomas, seu controle é ineficiente (MACHADO et al., 2006). Machado et al. (2008) comentam que a maior dificuldade em controlar plantas de capim-amargoso originadas de rizomas pode estar relacionada com a maior espessura na epiderme das faces adaxial e abaxial e maior espessura da lâmina foliar, quando comparadas com plantas provenientes de sementes. Ainda, observaram grande quantidade de amido nos rizomas, que pode dificultar a translocação do glifosato e permitir rápida rebrota da parte aérea das plantas.

Tabela 3.5. Levantamento de bulas de formulações comerciais de glifosato registradas no Brasil com recomendação de uso para controle de capim-amargoso (*D. insularis*) com até 2 a 3 perfilhos. Piracicaba - SP, 2020.

Marca	Formulação	Titular do Registro	¹ Dose L p.c. ha ⁻¹	² Dose g e.a. ha ⁻¹	Marca	Formulação	Titular do Registro	¹ Dose L p.c. ha-1	² Dose g e.a. ha-1
Astral	360	Prentiss Química	1,5	540	Glifoxin	360	Helm do Brasil	2,0	720
Braddock	360	Solus	1,5	540	Glister	360	Sinon do Brasil	2,0	720
Credit	360	Nufarm	1,5	540	Glizmax Prime	480	Dow AgroSciences	2,5	1200
Decisive	480	Monsanto	3,0	1440	Glyphotal	360	UPL	2,0	720
Direct	720	Monsanto	2,5	1800	Maxizato	720	Agro Import	1,5	1080
Gli Ouro	360	Ouro Fino	3,0	1080	Nufosate	360	Nufarm	1,5	540
Gli Over	360	Iharabras	3,0	1080	Nufosate WG	720	Nufarm	1,5	1080
Gli Up 480 SL	360	Cropchem	3,0	1080	Radar	360	Monsanto	1,0	360
Gli Up 720 WG	720	Cropchem	1,5	1080	Radar WG	720	Monsanto	1,5	1080
Gliato	360	Prentiss Química	3,0	1080	Ridover	720	Rainbow	1,5	1080
Glifocopa 720 WG	720	Copalliance	1,5	1080	Roundup NA	360	Monsanto	1,5	540
Glifoready	540	Nufarm	2,0	1080	Roundup Original	360	Monsanto	1,5	540
Glifosal	360	Xingfa e Wenda	1,5	540	Roundup Original DI	370	Monsanto	3,0	1110
Glifosato 72 WG Alamos	720	Alamos Brasil	1,5	1080	Roundup Transorb	480	Monsanto	1,5	720
Glifosato 720 WG Nortox	720	Nortox	2,5	1800	Roundup Ultra	650	Monsanto	0,5	325
Glifosato Alta 480 SL	360	Alta	1,5	540	Roundup WG	720	Monsanto	2,3	1620
Glifosato Atanor 48	356	Albaugh	2,0	712	Rustler	360	Monsanto	1,5	540
Glifosato Atar 48	356	Albaugh	2,0	712	Shadow	356	Albaugh	2,0	712
Glifosato CCAB 480 SL	360	CCAB Agro	2,0	720	Shadow 480 SL	360	Albaugh	1,5	540
Glifosato CCAB BR	360	CCAB Agro	1,5	540	Soldier	720	Rainbow	1,5	1080
Glifosato Fersol 480	360	Ameribrás	1,5	540	Stinger	360	Monsanto	1,5	540
Glifosato Fersol 480 NA	360	Ameribrás	1,5	540	Stinger WG	720	Monsanto	2,3	1620
Glifosato High Load	540	Nufarm	2,0	1080	Tecnup	360	TecnomyI	1,5	540
Glifosato IPA 480	360	Rainbow	1,5	540	Topatudo	360	Agro Import	1,5	540
Glifosato K Atanor	356	Albaugh	4,0	1424	Touchdown	500	Syngenta	2,8	1400
Glifosato Nortox	360	Nortox	2,0	720	Trop	355,67	Adama	3,0	1067
Glifosato Nortox 480 BR	360	Nortox	3,0	1080	Tupan	360	CropChem	3,0	1080
Glifosato Nortox WG	720	Nortox	2,5	1800	Tupan 720 WG	720	CropChem	1,5	1080
Glifosato Nuf BR	360	Nufarm	1,5	540	Xeque Mate	500	Iharabras	1,4	700
Glifosato SL 480 Alamos	360	Alamos Brasil	1,5	540	Zapp QI 620	500	Syngenta	1,4	700
Glifosato Soma 480 SL	360	CCAB Agro	1,5	540	Zavit	688	Alta	0,5	344
Média g e. a. ha⁻¹									876,23

¹Mapa 2020; Rodrigues e Almeida 2018, ²Resultado expresso em gramas de glifosato (equivalente ácido).

Tabela 3.6. Variáveis avaliadas, parâmetros do modelo logístico¹, coeficiente de determinação (R²) e controle (C) ou de redução de crescimento (GR) para a suscetibilidade de biótipos de *D. insularis* ao herbicida glifosato. Piracicaba - SP, 2020.

Variável	Parâmetros				R ²	C ₈₀ ou GR ₈₀	Erro Padrão
	P _{mín}	a	b	c			
Controle	-	100,95	440,95	-2,01	0,998	857,39	± 81,85
Massa Seca	-1,08	100,11	485,11	1,99	0,998	941,16	± 127,35

$$^1 y = a/(1+(x/b)^c) \text{ ou } y = P_{\min} + a/(1+(x/b)^c)$$

Machado et al. (2008) caracterizaram o rizoma das plantas de *D. insularis* e observaram a presença de grande quantidade de amido, provavelmente, responsável pela tolerância ao glifosato, dificultando a translocação e permitindo a rebrota da parte aérea, após tratada com o herbicida. Quando ocorre a perenização (rizoma formado), as plantas produzem elevada quantidade de sementes, revestidas por muitos pelos, facilmente dispersas pelo vento, permitindo a colonização de novos locais (LORENZI, 2014).

Correia, Leite e Garcia (2010), constataram suscetibilidade diferencial de populações de capim-amargoso ao herbicida glifosato, o que já evidenciava a seleção de populações desta espécie resistente ao produto. Neste sentido, desde 2011, tem sido divulgados relatos de resistência do capim-amargoso ao herbicida glifosato (MELO, 2011; CARVALHO et al., 2011).

3.4 Conclusões

Comparando-se os biótipos suscetíveis de *D. insularis* com os padrões da literatura científica internacional e as médias de bulas, pôde-se concluir com segurança que a dose discriminatória obtida através da “base-line” de suscetibilidade entre as populações de capim-amargoso é de 960 g e.a. ha⁻¹ glifosato.

Referências

BECKIE, H.J.; FRIESEN, L.F.; NAWOLSKY, K.M.; MORRISON, I.N. A rapid bioassay to detect trifluralin-resistant green foxtail (*Setaria viridis*). **Weed Technology**, v.4, n.1, p.505-508, 1990.

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

BOURGEOIS, L; MORRISON, I.N. Mapping risk areas for resistance to ACCase inhibitor herbicides in Manitoba. **Canadian Journal of Plant Science**, v.77, n.1, p.173-179, 1997.

BRADSHAW, L.D.; PADGETTE, S.R.; KIMBALL, S.L.; WELLS, B.H. Perspectives on glifosato resistance. **Weed Technology**, v.11, n.1, p.189–198, 1997.

CANEDO, I.F.; ARAÚJO, L.S.; SILVA, L.G.B.; VALENTE, M.S.; FREITAS, M.A.M.; CUNHA, P.C.R. Susceptibilidade diferencial ao herbicida glifosato e capacidade de rebrota de populações de capim-amargoso. **Revista Ceres**, v.66, n.1, p.18-25, 2019.

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

CARVALHO, S.J.P.; LOMBARDI, B.P.; NICOLAI, M.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; MEDEIROS, D. Curvas de dose-resposta para avaliação do controle de fluxos de emergência de plantas daninhas pelo herbicida imazapic. **Planta Daninha**, v.23, n.3, p.535-542, 2005.

CAVALIERI, D.J. **Resistência de populações de *Digitaria insularis* (L). Fedde a herbicidas: frequência de ocorrência e interações entre formulações de glifosato e adjuvantes**. 2017. 110p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu - SP, 2017.

CHRISTOFFERS, M.J. Genetic aspects of herbicide-resistant weed management. **Weed Technology**, Lawrence, v.13, n.3, p.647-652, 1999.

CHRISTOFFOLETI, P.J. Curvas de dose-resposta de biótipos resistente e suscetível de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da ALS. **Scientia Agricola**, 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 de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3. ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a resistência de Plantas aos Herbicidas (HRAC-BR), 2008. p.3-22.

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.) **Glifosato**. Botucatu: FEPAF, 2009. p.309-356.

CORREIA, N.M.; LEITE, G.J.; GARCIA, L.D. Resposta de diferentes populações de *Digitaria insularis* (L.) Fedde ao herbicida glifosato. **Planta Daninha**, 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 glifosato-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) in Indiana. **Weed Technology**, v.22, n.2, p.331-338, 2008.

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

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

GONÇALVES NETTO, A.; GOVEIA, Y.D.; CARVALHO, S.J.P. Monitoramento da ocorrência de biótipos de capim-amargoso resistentes ao herbicida glifosato na região do Sul de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 14, n.1, p.38-46, 2015.

HEAP, I. **The international survey of herbicide resistant weeds**. Disponível em: www.weedscience.org. Acesso em: 07 fev. 2020.

LAMEGO, F.P.; VIDAL, R.A. Resistance to glyphosate in *Conyza bonariensis* and *Conyza canadensis* biotypes in Rio Grande do Sul, Brazil. **Planta Daninha**, v.26, n.2, p.467-471, 2008.

LORENZI H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. 7a ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2014. 383p.

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

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**, v.26, n.1, p.01-08, 2008.

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

[MAPA] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 07 fev. 2020.

NORSWORTHY, J.K.; TALBERT, R.E.; HOAGLAND, R.E. Chlorophyll fluorescence for rapid detection of propanil-resistant barnyard-grass (*Echinochloa crus-galli*). **Weed Science**, v.46, n.2, p.163-169, 1998.

OWEN, M.J.; MARTINEZ, N.J.; POWLES, S.B. Multiple herbicide-resistant wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations dominate Western Australian cropping fields. **Crop and Pasture Science**, v.66, n.10, p.1079-1085, 2015.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de Herbicidas**. 7a ed. Londrina, PR: IAPAR, 2018. 764p.

ROSENBAUM, K.K.; BRADLEY, K.W. A survey of glyphosate resistant waterhemp in Missouri soybean fields and prediction of glyphosate resistance in future waterhemp populations based on in-field observations and management practices. **Weed Technology**, v.27, n.4, p.656-663, 2013.

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

SANTOS, G.; OLIVEIRA JR., R.S.; CONSTANTIN, J.; FRANCISCHINI, A.C.; OSIPE, J.B. Multiple resistance of *Conyza sumatrensis* to chlorimuron-ethyl and to glyphosate. **Planta Daninha**, v.32, n.2, p.409-416, 2014a.

SANTOS, G.; OLIVEIRA JR., R.S.; CONSTANTIN, J.; FRANCISCHINI, A.C.; MACHADO, M.F.; MANGOLIN, C.A.; NAKAJIMA, J.N. *Conyza sumatrensis*: A new weed species resistant to glyphosate in the Americas. **Weed Biology and Management**, v.14, n.2, p.106-114, 2014b.

SCHULTZ, J.L.; CHATHAM, L.A.; RIGGINS, C.W.; TRANEL, P.J.; BRADLEY, K.W. Distribution of herbicide resistances and molecular mechanisms conferring resistance in Missouri waterhemp (*Amaranthus rudis* Sauer) populations. **Weed Science**, v.63, n.1, p.336-345, 2015.

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

SILVEIRA, H.M. **Confirmação e caracterização fisiológica de *Digitaria insularis* resistente ao glifosato**. 2017. 39p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2107.

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

THARAYIL-SANTHAKUMAR, N. **Mechanism of herbicide resistance in weeds**. Amherst: University of Massachusetts, 2002. 38p.

4 MONITORAMENTO DA DISPERÇÃO DE *Digitaria insularis* RESISTENTE AO GLIFOSATO EM ÁREAS PRODUTORAS DE SOJA DO BRASIL

Resumo

O mapeamento da dispersão de populações de capim-amargoso resistente ao glifosato, nas áreas de soja, é uma ferramenta de auxílio na determinação das razões que estejam ocasionando a expressão da resistência da planta daninha. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi realizar o mapeamento da dispersão de populações de capim-amargoso resistentes ao glifosato, nas principais regiões produtoras de soja do Brasil. As sementes de capim-amargoso foram coletadas entre as safras de 2015/16 a 2018/19. A dose de 960 g e.a. ha⁻¹ de glifosato, utilizada para determinar as populações resistentes, foi fundamentada na dose discriminatória determinada em outro segmento da pesquisa já realizada. A planta daninha, no momento da aplicação, encontrava-se com 2 a 3 perfilhos, sendo proveniente da germinação das sementes destas populações, que foram coletadas no campo em áreas de “escapes” da aplicação de glifosato. O experimento foi conduzido em condições de casa-de-vegetação, sendo utilizadas duas plantas por vaso. O controle foi avaliado através de escala visual de controle, sendo determinada, por população, a frequência de parcelas (vasos) controladas pelo glifosato, aos 28 dias após a aplicação, sendo então as populações classificadas em resistentes, em processo de segregação e suscetíveis ao glifosato. Conclui-se que as populações de capim-amargoso resistentes ao glifosato no Brasil estão dispersas em todas as regiões produtoras de soja avaliadas, porém com baixa frequência (22,5% do total das amostras), sendo esta frequência variável por região avaliada.

Palavras chave: Capim-amargoso, Mapeamento, Resistência a herbicidas.

4 MONITORING OF THE DISPERSION OF *Digitaria insularis* RESISTANT TO THE GLYPHOSATE IN THE MAIN SOYBEAN PRODUCING AREAS OF BRAZIL

Abstract

The current historical mapping of glyphosate-resistant sourgrass dispersion in soybean areas is an aiding tool in determining reasons which occasionally cause an expression of weed resistance. Therefore, the objective of this paper has been mapping the dispersion of glyphosate-resistant sourgrass in the main soybean producing regions of Brazil. Sourgrass seeds were collected in harvests from 2015/16 to 2018/19. The dose of 960 g a.a. ha⁻¹ of glyphosate, used to determine resistant populations, was based on discriminated doses, determined in another segment of the research which has already been carried out. The weed, at the time of the application, was found with 2 to 3 profiles, proceeding from the germination of such populations, which were collected in the field in areas where there has been a "leakage" in the glyphosate application. The experiment was carried out under greenhouse conditions, using two plants in each vase. The control was evaluated through a visual one scale, being determined, by population, the frequency of vessels controlled by the glyphosate, on the 28th day after the application, with the populations being then classified into resistant; within segregation process; and susceptible to glyphosate. In conclusion, the glyphosate-resistant populations of sourgrass in Brazil are spread throughout all the evaluated soybean regions, but with low frequency (22.5% of the total samples), being such frequency, variable in the evaluated regions.

Keywords: Sourgrass, Mapping, Herbicide resistance.

4.1 Introdução

Atualmente, uma das principais discussões acerca do manejo de plantas daninhas nas culturas agrícolas brasileiras ou mundiais é a seleção de biótipos resistentes a herbicidas. A extensão das áreas agrícolas detectadas com a presença de biótipos de plantas daninhas resistentes pode ser considerada de pequena escala quando comparada com a área agrícola total, mas tem aumentado em taxa elevada (LÓPEZ-OVEJERO et al., 2006a).

Ao grupo de indivíduos possuidores de carga genética semelhante e pouco diferenciados da maioria dos indivíduos da espécie dá-se o nome de biótipo (KISSMANN, 1996). A resistência de plantas daninhas a herbicidas é definida como a capacidade inerente 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).

Trata-se de um fenômeno natural que ocorre espontaneamente nas populações, não sendo, portanto, o herbicida o agente causador, mas sim selecionador dos indivíduos resistentes que se encontram em baixa frequência inicial (CHRISTOFFOLETI; VICTORIA FILHO; SILVA, 1994; LÓPEZ-OVEJERO et al., 2006b).

O capim-amargoso (*Digitaria insularis*) é uma planta daninha muito frequente em pastagens, lavouras de café, pomares, beiras de estrada e terrenos baldios. É menos comum em solos cultivados com frequência, contudo é uma das mais importantes infestantes de áreas de plantio direto de cereais no sul do país. Vegeta com grande vigor, formando touceiras que florescem praticamente durante todo o verão (LORENZI, 2008).

O primeiro caso relatado sobre um biótipo de *D. insularis* resistente ao glifosato, veio do Paraguai, no ano de 2006 (HEAP, 2020). O fato de ser uma planta que se pereniza nas áreas agrícolas, produz alta quantidade de sementes, tendo um rápido desenvolvimento vegetativo inicial e não ser palatável ao gado (LORENZI, 2008), associado ao fato das doses de glifosato terem de aumentar com o crescimento da mesma, é indicativo do risco de desenvolvimento de resistência (DUKE; POWLES, 2008; POWLES; YU, 2010).

O glifosato é o herbicida de maior importância mundial, sendo utilizado por muitos anos no controle de plantas daninhas anuais ou perenes em diversos sistemas de produção (FAIRCLOTH et al., 2001; BLACKSHAW; HARKER, 2002). O aumento na adoção de sistemas de produção conservacionistas (plantio direto) e a maior flexibilidade para aplicação do produto em culturas geneticamente modificadas (transgênicas) resultaram em maior risco de seleção de biótipos resistentes de plantas daninhas, por consequência da maior pressão de seleção imposta / número de aplicações (NEVE et al., 2003; CHRISTOFFOLETI, 2008).

O mapeamento da ocorrência de resistência pode auxiliar na determinação da gravidade do problema e auxiliar na identificação de características climáticas ou de manejo em comum que estejam ocasionando a expressão da resistência ou apressando o processo de seleção do biótipo resistente (VARGAS et al., 2016; ANDRES et al., 2007).

Em outros países como Canadá e Estados Unidos, monitoramentos da dispersão de plantas daninhas resistentes a herbicidas são frequentemente realizados (BECKIE et al., 2008; BYKER et al., 2013; MATZARIF et al., 2015). No Brasil, alguns trabalhos presentes na literatura referem-se ao mapeamento da resistência de plantas daninhas como *Bidens pilosa* (HERNANDES; VIDAL; WINKLER, 2005), *Euphorbia heterophylla* (VIDAL et al., 2004) aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) no sul do Brasil, *Lolium multifolium* (VARGAS et al., 2016) e *Digitaria insularis* ao herbicida glifosate (LÓPEZ-OVEJERO et al., 2017). Esses autores concluíram que a resistência se desenvolveu independentemente, sobretudo pela ausência de práticas de manejo ou rotação de princípios ativos como forma de retardar o aparecimento de resistência e a necessidade dos produtores em adotar um sistema de manejo pró-ativo.

Desta forma, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de monitorar a dispersão de *D. insularis* resistente ao herbicida glifosato nas principais áreas produtoras de soja do Brasil.

4.2 Material e métodos

Os experimentos foram desenvolvidos em casa-de-vegetação pertencente ao Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP, no município de Piracicaba, São Paulo (22° 42'S; 47° 37' W; 545 m de altitude). As sementes de capim-amargoso (*D. insularis*) de diferentes regiões produtoras de soja do Brasil foram coletadas ao longo das safras de 2016 (132 amostras), 2017 (210), 2018 (160) e 2019 (110). As populações foram provenientes dos estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Minas Gerais Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Tocantins. As coletas de sementes ocorreram entre os meses de janeiro e março de cada safra, em áreas onde foram constatadas falhas no controle após a aplicação de glifosato.

As coletas foram realizadas em bulk, sendo amostradas aproximadamente 50 plantas por local de coleta, formando uma amostra composta de pelo menos 1000 sementes (BURGOS et al., 2013). As sementes foram armazenadas em sacos de papel e identificadas quanto às coordenadas geográficas, municípios e estado pertinentes a cada uma.

Para instalação do experimento as sementes foram distribuídas em excesso em bandejas plásticas, com capacidade para 1 litro de substrato. Quando as plantas se encontravam em início

de perfilhamento foram transplantadas para vasos com capacidade de 200 mL preenchidos com substrato comercial, onde foram mantidas até o final do experimento na densidade de 3 plantas por vaso.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. A dose de 960 g e.a. ha⁻¹ do herbicida glifosato para o controle em pós-emergência utilizada no experimento foi determinada de acordo com o resultado obtido no segmento anterior da pesquisa, já realizada. Uma dose única pode ser utilizada para a classificação das populações quanto a resistência se esta resultar na sobrevivência das plantas resistentes e na morte das suscetíveis (BECKIE et al., 2000; BURGOS, 2015).

As aplicações foram realizadas quando as plantas apresentavam 2 a 3 perfilhos. As pulverizações foram executadas priorizando as condições ambientais favoráveis: umidade relativa do ar acima de 60%, temperatura abaixo de 30 °C e o solo úmido. Foi utilizado um equipamento de pulverização costal com pressão constante a base de CO₂, composto por duas pontas do tipo leque, da marca comercial XR 110.02. calibrado a um volume de aplicação de 200 L ha⁻¹.

O controle das plantas foi avaliado utilizando a escala de 0 à 100%, em que 0% significa nenhuma injúria causada e 100% a morte da planta. As avaliações ocorreram aos 28 dias após a aplicação (DAA) dos tratamentos e foram utilizadas para classificar as populações como resistente (R), segregante (r) ou suscetível (S), baseando-se na metodologia utilizada por López-Ovejero et al. (2017), apresentada na Tabela 2.

Com base nas coordenadas geográficas de cada local de coleta e no resultado da avaliação das amostras, foram elaborados mapas com a distribuição espacial das amostras coletadas, utilizando o software QGIS 2.14.12 (QGIS Development Team, 2017). Os pontos de cada população de capim-amargoso foram coloridos nos mapas conforme a respectiva classificação (Tabela 4.1) após a avaliação de controle aos 28 DAA. Foram calculadas a frequência de populações nos diferentes estados com resistência ao herbicida glifosato, bem como a porcentagem de suscetibilidade.

Tabela 4.1. Critério, classificação e cor para resistência no Brasil.

Critério	Classificação	Cor
Todos as repetições com controle > 80%	S- Suscetível	Branco
Uma ou duas repetições com controle < 80%	r- Segregante	Amarelo
Três ou mais repetições com controle < 80%	R- Resistente	Vermelho

Adaptado de López-Ovejero et al. (2017).

4.3 Resultados e discussão

Foram avaliadas 612 amostras de capim-amargoso nos quatro anos de monitoramento. As áreas avaliadas revelaram baixa frequência de resistência ao glifosato desde o primeiro ano de monitoramento. As populações suscetíveis (S) somaram 77,45%, enquanto aquelas classificadas como resistentes (R) e segregantes (r) não ultrapassaram os 22,55% (Tabela 4.2). Em todos os estados avaliados foram encontradas populações resistentes ao glifosato (R ou r), em pelo menos um ano de avaliação (Figura 4.1 e Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Frequência (%) de populações de capim-amargoso suscetíveis (S), segregantes (r) e resistentes (R) a glifosato no Brasil, amostrados nos anos de 2016, 2017, 2018 e 2019. Piracicaba - SP, 2020.

Herbicida	Classe	2016/17/18/19
Glifosato 960 g i.a. ha ⁻¹	S	474
	r	32
	R	106
	Total	612

Dados semelhantes foram encontrados em pesquisa realizada por López-Ovejero et al. (2017) com populações de *Digitaria insularis* onde foram encontradas plantas resistentes ao glifosato em todas as regiões amostradas no Brasil. Foram avaliados 2.593 biótipos em 14 estados brasileiros entre os anos de 2012 a 2015, sendo que 26% das amostras foram consideradas resistentes ao glifosato.

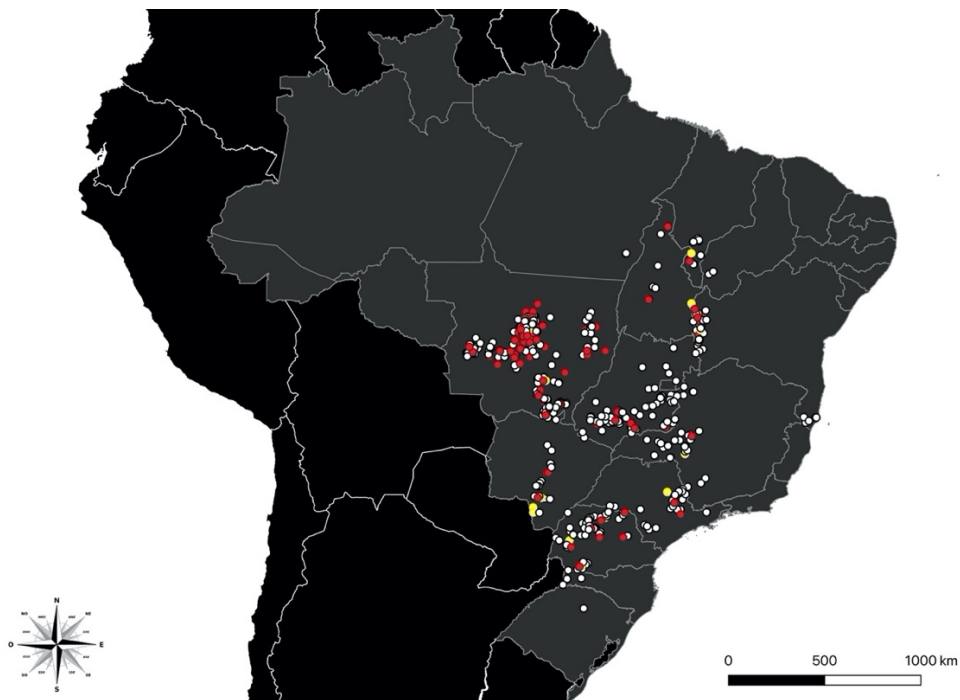


Figura 4.1. Dispersão de populações de capim-amargoso resistentes a glifosato no Brasil entre as safras de 2016 a 2019.

O estado mais representado pela amostragem foi o Mato Grosso, onde foram amostradas 29,88% (251 amostras) do total avaliado entre os anos de 2016 a 2019 (Tabela 4.3). Os estados com menos populações R ou r são Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. Já os estados da Bahia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Paraná são os estados com maiores frequências de R ou r para glifosato (Tabela 4.3). A expansão de áreas agrícolas no Brasil Central com culturas resistentes ao glifosato (culturas RR), principalmente soja e milho, têm contribuindo para a forte seleção de biótipos resistentes de plantas daninhas. Isto devido à elevada pressão de seleção exercida pelo uso de glifosato nas culturas RR, promovendo a seleção de plantas daninhas resistentes (YANNICCARI et al., 2016).

Tabela 4.3. Número (N°) e frequência (%) de populações com resistência ¹(R+r) a glifosato nos estados amostrados entre os anos de 2016 a 2019. Piracicaba, SP. 2020.

Estado	Glifosato (960)		
	N°	Σ(R+r)	%
BA	45	13	28,89
GO	96	12	12,50
MA	26	6	23,08
MG	37	2	5,41
MS	22	6	27,27
MT	251	75	29,88
PR	67	17	25,37
RS	1	0	0,00
SC	4	0	0,00
SP	42	3	7,14
TO	21	4	19,05
Total	612	138	22,55

¹(R + r = Resistente + Segregante). BA: Bahia, GO: Goiás, MA: Maranhão, MT: Mato Grosso, MS: Mato Grosso do Sul, MG: Minas Gerais, PR: Paraná, RS: Rio Grande do Sul, SC: Santa Catarina, SP: São Paulo

O primeiro caso relatado sobre o surgimento de um biótipo de *D. insularis* (capim-amargoso) resistente ao glifosato veio do Paraguai, no ano de 2006 (HEAP, 2020). 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 (KISSMANN; GROTH, 1997; CLAYTON et al., 2006; LORENZI, 2008).

Estas características, aliadas ao grande percentual germinativo, fazem com que esta espécie tenha alta capacidade de disseminação. Outro dos motivos que agravaram o problema do capim-amargoso é o potencial de redução da produção, em milho e soja, por exemplo, pode atingir perdas de 32 e 44%, respectivamente (GAZZIERO et al., 2012; GEMELLI et al., 2013). Portanto, trata-se de uma espécie altamente competitiva e de difícil controle após o desenvolvimento de curtos rizomas (MACHADO et al., 2006).

O ponto chave no incremento da ocorrência de *D. insularis* é que, uma vez que a planta esteja estabelecida com o início da formação dos rizomas e posterior formação de grandes touceiras, ela se torna de difícil controle. Uma vez ocorrido o processo de perenização, esta planta pode florescer e disseminar sementes com baixos níveis de dormência durante o ano todo (GEMELLI et al., 2012). Nesse contexto, devido ao diminuto tamanho de suas sementes e à dispersão ser realizada principalmente pelo vento, os fluxos de emergência dessa espécie são dependentes da profundidade em que as sementes se encontram e também da umidade do solo (PYON et al., 1977).

O movimento de máquinas agrícolas como colhedoras e semeadoras de grãos também pode ser responsável pelo fluxo gênico e, conseqüentemente, dispersão da resistência. No caso do capim-amargoso (*Digitaria insularis*), por exemplo, existem duas principais causas da rápida dispersão de populações resistentes. A primeira delas está relacionada ao fluxo de equipamentos alugados para a colheita de grãos, enquanto na segunda à pressão de seleção local exercida pelo uso do mesmo mecanismo de ação repetidamente (TAKANO et al., 2018).

4.4 Conclusões

Conclui-se que a resistência de capim-amargoso ao glifosato no Brasil está presente em todas as regiões produtoras de soja avaliadas, com frequência de 22,5% do total das amostras avaliadas.

Referências

- ANDRES, A.; CONCENÇO, G.; MELO, P.T.B.S.; SCHMIDT, M.; RESENDE, R.G. Detecção da resistência de capim-arroz (*Echinochloa* spp.) ao herbicida quinclorac em regiões orizícolas do sul do Brasil. **Planta Daninha**, v.25, n.1, p.221-226, 2007.
- BECKIE, H.J.; HEAP, I.M.; SMEDA, R.J.; HALL, L.M. Screening for herbicide resistance in weeds. **Weed Technology**, v.14, n.2, p.428-445, 2000.
- BECKIE, H.J.; LEESON, J.Y.; THOMAS, A.G.; BRENZIL, C.A.; HALL, L.M.; HOLZGANG, G.; LOZINSKI, C.; SHIRRIFF, S. Weed resistance monitoring in the Canadian Prairies. **Weed Technology**, v.22, n.3, p.530-543, 2008.
- BLACKSHAW, R.E.; HARKER, K.N. Selective weed control with glyphosate in glyphosate-resistant spring wheat (*Triticum aestivum*). **Weed Technology**, Lawrence, v.16, n.4, p.885-892, 2002.
- BURGOS, N.R. Whole-plant and seed bioassays for resistance confirmation. **Weed Science**, v.63, n.1, p.152-165, 2015.
- BURGOS, N.R.; TRANEL, P.J.; STREIBIG, J.C.; DAVIS, V.M.; NORSWORTHY, J.K.; RITZ, C. Review: confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. **Weed Science**, v.61, n.1, p.4-20, 2013.
- BYKER, H.P.; SOLTANI, N.; ROBINSON, D.E.; TARDIF, F.J.; LAWTON, M.B.; SIKKEMA, P.H. Occurrence of glyphosate and cloransulam resistant Canada fleabane (*Conyza canadensis* L. Cronq.) in Ontario. **Canadian Journal of Plant Science**, v.93, n.5, p.851-855, 2013.
- CHRISTOFFOLETI, P.J. **Aspectos de Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas**. 3.ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas Daninhas aos Herbicidas (HRAC-BR), 2008. 120p.

- 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 resistências de plantas daninhas a herbicidas**. 3ed. Piracicaba: HRAC-BR, 2008. p.3-30.
- CHRISTOFFOLETI, P.J.; VICTORIA FILHO, R.; SILVA, C.B. Resistencia de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, v.12, n.1, p.13-20, 1994.
- 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: 29 fev. 2020.
- DUKE, S.O.; POWLES, S.B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, v. 64, n.4, p.319–325, 2008.
- FAIRCLOTH, W.H.; PATTERSON, M.G.; MONKS, C.D.; GOODMAN, W.R. Weed management programs for glyphosate-tolerant cotton (*Gossypium hirsutum*). **Weed Technology**, v.15, n.3, p.544-551, 2001.
- GAZZIERO, D.L.P.; VOLL, E.; FORNAROLLI, D.; ADEGAS, L.F.S. Efeitos da convivência do capim-amargoso na produtividade da soja. In: XXVIII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, Campo Grande. **Anais**, SBCPD. p.346-350, 2012.
- GEMELLI, A; OLIVEIRA JR, R.S.; CONSTANTIN, J.; BRAZ, G.B.P.; JUMES, T.M.C.; GHENO, E.A.; RIOS, F.A.; FRANCHINI, L.H.M. Estratégias para o controle de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao glyphosate na cultura milho safrinha. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.12, n.2, p.162-170, 2013.
- GEMELLI, A.; OLIVEIRA JÚNIOR, R.S.; CONSTANTIN, J.; BRAZ, G.B.P.; JUMES, T.M.C.; OLIVEIRA NETO, A.M.; 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**, v.11, n.2, p.231-240, 2012.
- HEAP, I. **The international survey of herbicide resistant weeds**. Disponível em: www.weedscience.org. Acesso em: 07 fev. 2020.
- HERNANDES, G.C., VIDAL, R.A. AND WINKLER, L.M. Levantamento de práticas agrônômicas e distribuição geográfica de *Bidens* spp. resistentes aos herbicidas inibidores de ALS nos Estados do Rio Grande do Sul e do Paraná. **Planta Daninha**, v.23, n.4, p.677-682, 2005.
- KISSMANN, K. G. **Resistência de plantas a herbicidas**. São Paulo: BASF Brasileira, 1996. 33 P.
- KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF, v.1, 1997. p.510- 513.
- LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CARVALHO, S.J.P.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Suscetibilidade comparativa de herbicidas pós-emergentes de biótipos de *Digitaria ciliaris* resistente e suscetível aos inibidores da ACCase. **Planta Daninha**, v.24, n.4, p.789-796, 2006b.

LÓPEZ-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 da soja. **Planta Daninha**, v.24, n.2, p.399-406, 2006a.

LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; TAKANO, H.K.; OLIVEIRA JR., R.S.; CAVENAGHI, A.L.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; NICOLAI, M. Frequency and dispersal of glyphosate-resistant sourgrass (*Digitaria insularis*) populations across Brazilian agricultural production areas. **Weed Science**, v.65, n.2, p.285-264, 2017.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 640p.

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

MATZRAFI, M.; LAZAR, T.W.; SIBONY, M.; RUBIN, B. *Conyza* species: distribution and evolution of multiple target-site herbicide resistance. **Planta**, v.242, n.1, p.259-267, 2015.

NEVE, P.; DIGGLE, A.J.; SMITH, F.P.; POWLES, S.B. Simulating evolution of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. II. Past, present and future of glyphosate use in Australian cropping. **Weed Research**, v.43, n.6, p.418-427, 2003.

POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n.1, p. 317-347, 2010.

PYON, J.Y.; WHITNEY, A.S.; NISHIMOTO, R.K. Biology of sourgrass and its competition with buffelgrass and guineagrass. **Weed Science**, v.25, n.2, p.171-174, 1977.

TAKANO, H.K.; OLIVEIRA JR. R.S.; CONSTANTIN, J.; MACHADO, M.F.P.S.; MANGOLIN, C.A.; BEVILAQUA, M.R.R. Spread of glyphosate-resistant sourgrass (*Digitaria insularis*): independent selections or merely propagule dissemination? **Weed Biology and Management**, v.18, n.1, p.1-13, 2018.

VARGAS, L.; SCHNEIDER, T.; AGOSTINETTO, D.; BIANCHI, M.A. Geographic distribution of ryegrass resistant to the clethodim herbicide in Rio Grande do Sul. **Planta Daninha**, v.34, n.2, p.365-376, 2016.

VIDAL, R. A.; WINKLER, L.M.; HERNANDES, G.C.; FLECK, N.G.; MEROTTO JR, A.; TREZZI, M.M. A field survey of crop management practices and distribution of ALS resistant *Euphorbia heterophylla* in two states in southern Brazil. **Planta Daninha**, v.22, n.3, p.403-410, 2004.

YANNICCARI, M.; VILA-AIUB, M.; ISTILART, C.; ACCIARESI, H.; CASTRO, A. M. Glyphosate resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) is associated with a fitness penalty. **Weed Science**, v.64, n.1, p.71-79, 2016.

5 GENÔMICA POPULACIONAL DE *Digitaria insularis* NAS PRINCIPAIS REGIÕES PRODUTORAS DE SOJA NO BRASIL

Resumo

A expansão de áreas agrícolas no Centro-Oeste brasileiro com culturas resistentes ao glifosato (culturas RR), principalmente soja e milho, têm contribuído para a seleção de biótipos resistentes de plantas daninhas. Isto se deve à elevada pressão de seleção exercida pelo uso do glifosato nas culturas RR. Das espécies com resistência ao glifosato no Brasil, o capim-amargoso tem se mostrado a principal espécie desta problemática, devido à sua grande capacidade de sobreviver e multiplicar-se em ambientes distintos. A cronologia dos eventos de resistência de capim-amargoso a glifosato evidencia que a dispersão das populações desta planta daninha se deu em direção ao norte do Brasil, a partir do oeste do Paraná, e foi impulsionada principalmente pelo transporte de maquinário usados nas áreas de produção de grãos. Por outro lado, relatos de resistência no Estado de São Paulo vieram de áreas tradicionais de produção de citros, cujo manejo não envolve maquinário utilizado nas áreas de produção de grãos, tão pouco estão nas rotas de deslocamento da região Sul do Brasil para região Centro-Oeste brasileira. Para testar a hipótese de que a resistência de *D. insularis* ao glifosato pode ter sido dispersa pelo Brasil a partir de uma origem em comum, o presente estudo teve como objetivo: determinar o nível de divergência genética entre essas populações; analisar a estrutura genética dessas populações de capim-amargoso através marcadores SNPS obtidos a partir de bibliotecas de redução da complexidade do genoma usando *Genotyping by sequencing* - GBS; e esclarecer se as populações resistentes foram selecionadas independentemente ou se foram disseminadas a partir de um único ponto de origem. Observou-se que a estruturação genética das populações estudadas mostrou-se baixa, evidenciando um fluxo gênico marcante do Sul para o Norte do Brasil, acompanhando a rota de maquinários ligadas à cultura da soja RR. Um forte processo de seleção associado ao uso do herbicida glifosato e do manejo da cultura da soja como um todo, está em curso estruturando as populações. Enquanto as populações coletadas em Balsas-MA, Lucas do Rio Verde-MT, Sapezal-MT e Santa Rita do Trivelato-MT, foram selecionadas localmente ou sob biótipo de pouca correlação genética com o Sul do Brasil.

Palavras chave: Capim-amargoso, Mapeamento, Dinâmica populacional.

5 POPULATION GENOMICS OF *Digitaria insularis* IN THE MAIN SOYBEAN PRODUCING REGIONS IN BRAZIL

Abstract

The expansion of agricultural areas in the Brazilian Midwest, with glyphosate-resistant crops (RR crops), mainly soybeans and corn, has contributed to the selection of weed-resistant biotypes. This is due to the high selection pressure caused by the use of glyphosate in RR cultures. Among the glyphosate-resistant species in Brazil, sourgrass has shown to be the main one with such problem, due to its great ability to survive and multiply in different environments. The chronology of the events of the sourgrass' resistance to glyphosate has shown that the dispersion of the populations of such weed happened towards the north of Brazil, from the west of Paraná, and was driven mainly by the transportation of machinery used in the production areas of grain. On the other hand, reports of resistance in the state of São Paulo came from traditional citrus production areas, whose management does not involve machinery used in the areas of grain production, nor are they on the displacement routes from the southern region of Brazil to the Central-Brazilian West. To test the hypothesis that the resistance of *D. insularis*

to glyphosate may have been dispersed throughout Brazil from a common source, the present study has aimed to determine the level of genetic divergence between these populations; analyze the genetic structure of the sourgrass populations through SNPS markers obtained from genome complexity reduction libraries, by using *Genotyping by sequencing* - GBS; and clarify whether resistant populations were independently selected or disseminated from a single point of origin. The results have shown that the genetic structure of the studied populations was low, showing a marked gene flow from the South to the North of Brazil, following the route of machinery linked to the cultivation of RR soybean. A strong selection process associated with the use of the glyphosate herbicide and the management of soybean culture as a whole, is still in course, structuring populations. While the populations collected in Balsas-MA, Lucas do Rio Verde-MT, Sapezal-MT and Santa Rita do Trivelato-MT, were locally selected or under biotiposa with little genetic correlation with the South of Brazil.

Keywords: Sourgrass, Mapping, Population dynamics

5.1 Introdução

A engenharia genética e o melhoramento convencional de plantas permitiram a introdução e comercialização de culturas resistentes a herbicidas (glifosato, glufosinato de amônio, imidazolinonas, etc.) oferecendo vantagens significativas no controle de plantas daninhas (GREEN, 2012; BONNY, 2016). A expansão de áreas agrícolas no Brasil Central com culturas resistentes ao glifosato (culturas RR), principalmente soja e milho, têm contribuído para a seleção de biótipos resistentes de plantas daninhas. Isto se deve à elevada pressão de seleção exercida pelo uso do glifosato nas culturas RR, promovendo a seleção de biótipos de plantas daninhas resistentes a este herbicida (YANNICCARI et al., 2016).

A resistência de plantas daninhas aos herbicidas ocorre quando estas plantas sobrevivem ao uso do herbicida, completam seu ciclo de vida e produzem sementes viáveis, mesmo após aplicação de herbicidas em doses normalmente letais para biótipos de plantas daninhas selvagens (VENCILL et al., 2012). Biologicamente, populações de plantas daninhas resistentes a herbicidas estão naturalmente presentes nas áreas, mas ocorrem em baixas densidades (ALCÁNTARA-DE LA CRUZ et al., 2016). O surgimento de biótipos resistentes é decorrente de diferentes mecanismos de resistência, que podem estar relacionados ao local de ação do herbicida (POWLES, 2008; POWLES; YU, 2010).

Das espécies com resistência ao glifosato no Brasil, o capim-amargoso tem se mostrado a principal espécie desta problemática, devido à sua grande capacidade de sobreviver e multiplicar-se em ambientes distintos, o que dificulta seu controle e promove sua maior disseminação (MACHADO et al., 2006) quando comparado ao observado com plantas também problemáticas com a buva (*Conyza* spp) e de forma mais marcante, o azevem (*Lolium multiflorum*). O capim-amargoso ocorre em culturas perenes (café, citrus, eucalipto) e anuais

(soja, algodão e milho) onde a aplicação de glifosato é eficaz para outras, mas não para a espécie citada (CARVALHO et al., 2011). Portanto, maiores esforços têm sido canalizados para caracterização dos fatores envolvidos quanto a sua biologia, mecanismos de resistência, estratégias de dispersão e alternativas de manejo (CARVALHO et al., 2011; BARROSO et al., 2015; GILO et al., 2016; MARTINS et al., 2016; LÓPEZ-OVEJERO et al., 2017).

Observando-se trabalhos da literatura e a cronologia dos eventos de resistência de capim-amargoso a glifosato no Brasil parece claro que a dispersão das populações desta planta daninha se deu em direção ao norte do Brasil, a partir do oeste do Paraná, e foi impulsionada principalmente pelo transporte de maquinário usados nas áreas de produção de grãos (LÓPEZ-OVEJERO et al., 2017). Por outro lado, relatos de resistência no Estado de São Paulo (CHRISTOFFOLETI et al., 2009) vieram de áreas tradicionais de produção de citros, cujo manejo não envolve maquinário utilizado nas áreas de produção de grãos, tão pouco estão nas rotas de deslocamento da região Sul do Brasil para região Centro-Oeste brasileira, contudo possuem um longo histórico de uso de glifosato, em doses e frequência maiores que nos sistemas de produção de grãos.

A detecção de dois locais distintos de resistência levanta a hipótese de que as populações podem ter sido selecionadas independentemente. As estratégias para testar esta hipótese incluem uma investigação do nível de divergência genética entre populações de capim-amargoso e uma análise da estrutura genética dessas populações. Populações geneticamente divergentes têm baixo fluxo gênico e são geneticamente estruturadas (NEI, 1972). Apesar da ampliação de seu significado como uma importante planta daninha na América do Sul nos últimos anos, há uma falta de informações sobre o genoma do capim-amargoso, o que sugere que estudos sobre genética de populações para esta espécie podem ser úteis para seu adequado manejo, uma vez que a diversidade genética é uma das principais ferramentas para que as plantas daninhas se adaptem às estratégias de manejo que visam controlá-las (HOLT; HOCHBERG 1997).

Dentro deste contexto, a hipótese deste estudo é que a resistência de *D. insularis* ao glifosato pode ter sido dispersa pelo Brasil a partir de uma origem em comum. Para testar esta hipótese, o presente estudo teve como objetivo: determinar o nível de divergência genética entre essas populações; analisar a estrutura genética dessas populações de capim-amargoso através de bibliotecas de GBS; e esclarecer se as populações resistentes foram selecionadas independentemente ou se foram disseminadas a partir de um único ponto de origem.

5.2 Material e métodos

Amostragem

Os biótipos de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) foram amostrados em 12 localidades do Brasil (Tabela 4.1, Figura 4.1) totalizando 4 estados, a saber: Paraná (2 amostras), Mato Grosso (8 amostras), Tocantins (1 amostra) e Maranhão (1 amostra), sendo elas separadas entre indivíduos resistentes, segregantes e suscetíveis através de triagem considerando a dose discriminante de 960 gramas de equivalente ácido por hectare (g e.a ha⁻¹) de glifosato, conforme descrito no capítulo 3.

As coletas foram realizadas no ano de 2018 em áreas agrícolas normalmente exploradas com a cultura da soja. As plantas geradas destas amostras forneceram o tecido de folhas jovens de capim-amargoso (*Digitaria insularis*), os quais após coletados foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C até processamento posterior.

Tabela 5.1. Populações amostrais de capim-amargoso (*Digitaria insularis*), cidade da coleta, coordenadas geográficas e suscetibilidade. Piracicaba - SP, 2020.

Nome da Amostra	Cidade	Coordenadas Geográficas		Suscetibilidade
		Latitude	Longitude	
PRDVR	Dois Vizinhos - PR	-26,100278	-52,862778	Resistente
PRPGR	Ponta Grossa - PR	-24,433889	-50,353889	Resistente
TOPAR	Palmas - TO	-10,926667	-48,900000	Resistente
MABAI	Balsas - MA	-8,288889	-46,468611	Segregante
MTLVR	Lucas do Rio Verde - MT	-13,233889	-56,510000	Resistente
MTLRR	Lucas do Rio Verde - MT	-12,981389	-55,803056	Resistente
MTSPR	Sapezal - MT	-13,606944	-59,101667	Resistente
MTSRS	Santa Rita do Trivelato - MT	-13,853611	-55,479444	Resistente
MTDIS	Diamantino - MT	-13,843333	-57,358056	Suscetível
MTSOS	Sorriso - MT	-12,705000	-55,868056	Suscetível
MTNMS	Nova Mutum - MT	-13,714722	-56,205000	Suscetível
MTDIR	Diamantino - MT	-13,843333	-51,358056	Resistente

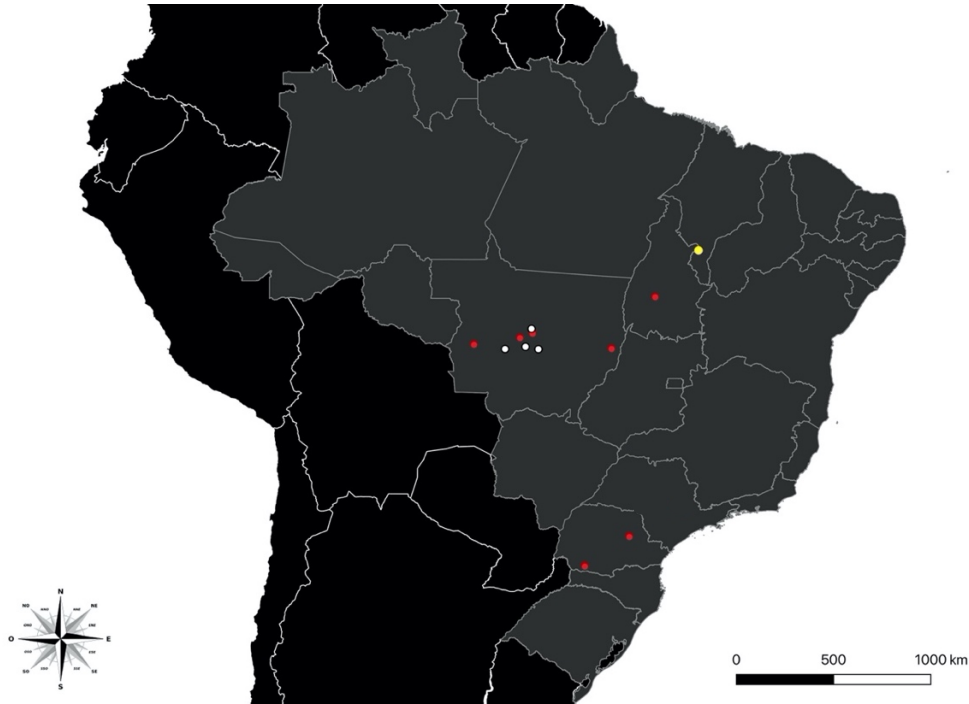


Figura 5.1. Distribuição das populações amostrais de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) selecionados para genômica de populações. Piracicaba - SP, 2020.

Extração de DNA, controle de qualidade e preparação e sequenciamento de bibliotecas RAD.

A extração de DNA foi realizada seguindo um protocolo padrão de CTAB (brometo de cetiltrimetilmetônio) (DOYLE; DOYLE, 1987). O DNA foi quantificado em um espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific) seguido de normalização. Eletroforese em gel e digestão enzimática com *HindIII* (Thermo Scientific) foram realizadas em todas ou 10% das amostras, respectivamente, para confirmar a qualidade e normalização do DNA e usado para construir bibliotecas genômicas - GBS, conforme descritos por Poland et al. (2012). O DNA genômico de cada amostra foi então, digerido com duas enzimas de restrição *PstI* + *MseI*, selecionadas conforme melhor perfil de restrição.

Após a digestão, adaptadores específicos para os sequenciadores Illumina (Illumina, San Diego, EUA) juntamente com sequências complementares as enzimas foram ligadas aos fragmentos. Os adaptadores são oligonucleotídeos comuns (IDT, com dessalinização padrão, escala de síntese 25 mM). Para o anelamento, os adaptadores foram submetidos a 95 °C e resfriados lentamente (1 °C por minuto) até 30 °C. Este procedimento foi realizado em um termociclador Applied Biosystems® Veriti® Thermal Cycler. Cada amostra recebeu um adaptador com sequências de códigos de barras específicas. Após a reação de ligação os

fragmentos foram então reunidos em um único *pool* (multiplex). Em seguida, foi feita uma amplificação por meio de PCR para o enriquecimento dos fragmentos no multiplex (Figura 4.2).

As bibliotecas foram validadas e quantificadas por meio de qPCR em um termociclador de tempo real CFX 384 (BioRad) utilizando o kit KAPA Library Quantification kit (KAPA Biosystems). Por fim, a biblioteca foi diluída para aproximadamente 1,8 pmol/ μ L. As bibliotecas foram sequenciadas na configuração *single read* e 150 pares de bases, utilizando o *kit* Mid Output v2 no equipamento NextSeq 500 na Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto.

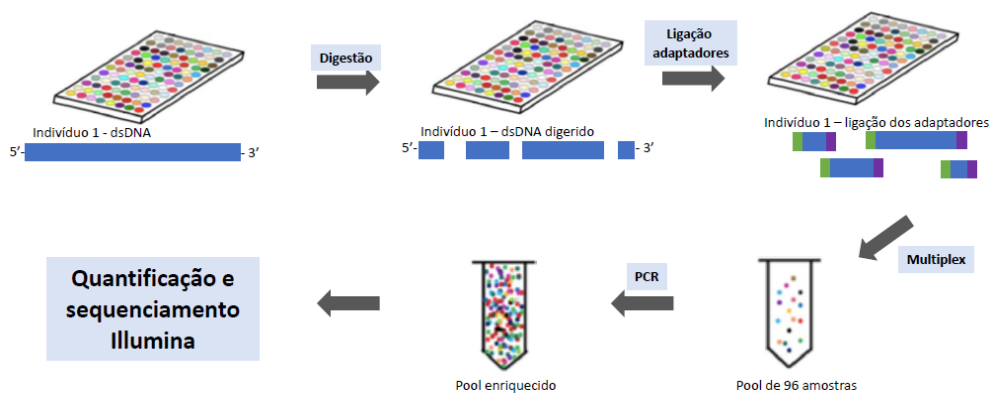


Figura 5.2. Esquema evidenciando as principais etapas do protocolo de Poland et al. (2012) para obtenção de SNPs por GBS. Piracicaba - SP, 2020.

Genotipagem e filtragem de SNPs

Um total de 96 amostras foram digeridas com as enzimas *PstI* + *MseI*, com código de barras individual, e corridos em uma única linha de sequenciamento *single-end* de 100 bp Illumina HiSeq2500 e posteriormente aparado para 90 bp para análise. Para separar as amostras *in silico* (demultiplexagem), foi utilizado o programa *process-radtags* da pipeline STACKS v.2.437 (CATCHEN et al., 2013). Durante essa etapa de separação foram usados filtros para o descarte de sequências de baixa qualidade, que não apresentassem o sítio de corte da enzima, ou aquelas cujos códigos de barra não pudessem ser recuperados (-r, -c, -q). Em seguida a abordagem *de novo* para a confecção do catálogo de loci GBS foi implementada, ou seja, sem um genoma de referência.

Durante o primeiro passo da sequência, o programa *ustacks* formou os loci putativos presentes em cada uma das amostras formando catálogos de SNPs individualizados. Durante esta etapa, foram selecionados os parâmetros de máxima divergência permitida em duas sequências para compor o mesmo *locus* de 2 mutações ($M=2$) e profundidade mínima da pilha de 3x ($m=3$). Todas as outras etapas subsequentes do STACKS se utilizaram dos parâmetros

padrões do programa assumindo uma relação paralela de variação entre ortólogos e parálogos ($M=n$) (ROCHETTE; RIVERA-COLÓN; CATCHEN, 2019).

Durante a última etapa da pipeline, o programa *populations* do STACKS utilizou a filtragem de loci com taxa de missing data ($r=40\%$), a frequência mínima de alelos MAF (5%), e máxima heterozigosidade observada (75%). Os dados resultantes foram salvos em formatos genepop, VCF, e structure e conversão para outros formatos, quando necessárias, foram feitas com PGDSPIDER 2.0 (LISCHER; EXCOFFIER, 2011).

Determinação de loci sob seleção natural

A determinação dos loci neutros e sob seleção positiva para as análises de estrutura genética e fluxo gênico foi feita com o BAYESCAN (FOLL; GAGGIOTTI, 2008). BAYESCAN se utilizava do método bayesiano via Monte Carlo Markov Chain (MCMC) para estimar coeficientes de F_{ST} específicos de populações e específicos de cada locus assumindo que as frequências alélicas possuem distribuição Dirichlet. BAYESCAN tem se mostrado robusto para detectar loci *outliers* mesmo em cenários demográficos complexos e superior a outros métodos comumente utilizados (PÉREZ-FIGUEROA et al., 2010).

A metodologia implementada pelo BAYESCAN estima a probabilidade posterior de cada locus de ser afetado por dois modelos alternativos (neutro e seleção). Um total de 20 corridas pilotos com 5000 interações cada antes de computar a cadeias de Markov. Foram utilizados 50000 passos de *burn-in* e 5000 interações com 10 de intervalo de desbaste (*thinning interval=10*). Consideramos o modelo neutro 10x mais provável que o modelo de seleção (*prior odd=10*) e corte para a distribuição posterior de $P>0,95$ para eleger SNP como candidatos para seleção positiva.

Diversidade genética e coeficiente de endogamia (F_{IS})

As medidas de diversidade genética e coeficientes de endogamia (F_{IS}) foram estimadas no programa estatístico R v3.4.1. A heterozigosidade esperada (H_E) foi calculada por meio do pacote *adegenet* (JOMBART; AHMED, 2011; ADAMACK; GRUBER, 2014).

O coeficiente de endogamia (F_{IS}) foi calculado de acordo com a fórmula $1 - (H_O/H_E)$. Variando de -1 a um, valores de F_{IS} próximos a zero indicam acasalamento aleatório, enquanto valores positivos indicam endogamia, e valores negativos indicam excesso de heterozigotos (HARTL; CLARK, 1997).

Estimativas de desequilíbrio de ligação (LD) e índices de associação (\bar{r}_d)

Para determinar o grau de desequilíbrio de ligação entre marcadores presente nas populações utilizadas, o índice de associação foi utilizado (\bar{r}_d) (AGAPOW; BURT, 2001). A falta de associação entre marcadores indica que os marcadores foram recombinados enquanto a associação significativa indica que ligação ou homoplasia podem ter causado o desvio das frequências genóticas esperadas em um cenário de cruzamentos aleatórios (AGAPOW; BURT, 2001). Para esta análise, as localidades amostradas foram analisadas separadamente utilizando o pacote *poppr* (KAMVAR; TABIMA; GRÜNWALD, 2014) no R se valendo de 1000 permutações.

Índice de fixação interpopulacional (F_{ST}), direção e magnitude do fluxo de migrantes

Migração relativa entre duas populações foi calculada com base na frequência alélica usando o pacote do R *diveRsity*. O Modelo utilizado compara populações estimando a direção e a magnitude do fluxo gênico baseado na estatística G_{ST} utilizando 10000 permutações para testar a significância estatística (NEI, 1973).

Análise da Estrutura Genética

A estrutura genética da população foi avaliada usando uma abordagem implementada usando o software ADMIXTURE 1.22 investigando valores de K variando de 1 até 15 (K=1-15, K sendo o número de populações ancestral usadas no modelo). O valor mais provável para K foi determinado de acordo com o valor correspondente pelo método de *cross-validation*. O valor de K com o menor valor de erro calculado pelo processo de *cross-validation* foi determinado como o número mais provável de populações ancestrais.

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada usando os pacotes *adegenet* (JOMBART, 2008) e *ade4* (DRAY; DUFOUR, 2007) do R. Análises de PCA foram conduzidas com marcadores neutros e com marcadores candidatos a seleção positiva.

5.3 Resultados

Diversidade e coeficiente de endogamia (F_{IS})

Os resultados mostram uma grande variação nos níveis de heterozigosidade esperada entre os diversos locais amostrados (Figura 5.3). Os locais com a maior e menor heterozigosidade esperadas foram no Mato Grosso, MTDIS e MTDIR respectivamente. Comparando as duas localidades no Paraná, PRDVR (em divisa com o Paraguai) teve menor heterozigosidade menor que PRPGR (ao norte).

Os valores encontrados para o coeficiente de endogamia também variaram significativamente entre os locais amostrados (Figura 5.4). Quatro localidades tiveram valores significativamente abaixo de zero, portanto exogâmicas, e 6 tiveram valores significativamente acima de zero, indicando endogamia (Figura 5.4). Comparando as duas localidades no Paraná, PRDVR está em processo de exogamia enquanto a localidade PRPGR está em processo de endogamia.

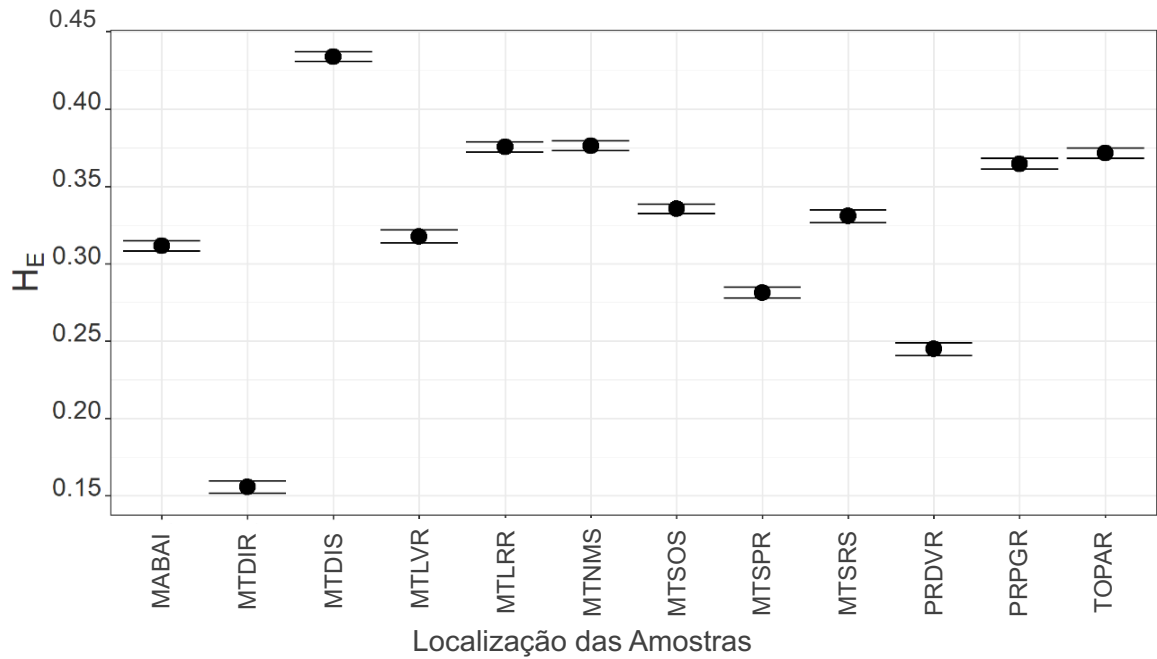


Figura 5.3. Heterozigosidade esperada (H_E) calculada para as 12 locais amostrados para capim-amargoso (*Digitaria insularis*) no Brasil. Círculos representam a média de valores encontrados para 4245 marcadores com intervalos de confiança de 95%. Piracicaba - SP, 2020.

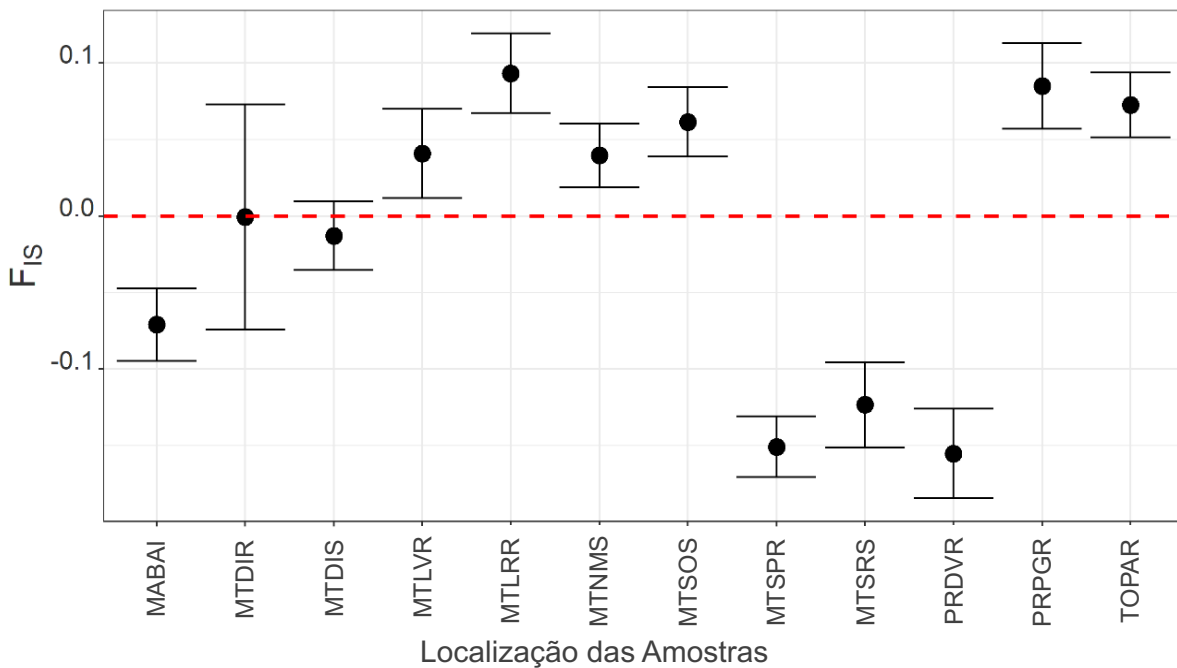


Figura 5.4. Coeficiente de endogamia (F_{IS}) calculado para as 12 locais amostrados para capim-amargoso (*Digitaria insularis*) no Brasil. Círculos representam a média de valores encontrados para 4245 marcadores com intervalos de confiança de 95%. Piracicaba - SP, 2020.

Desequilíbrio de ligação (LD)

A análise de desequilíbrio de ligação foi realizada a fim de inferir locais onde a reprodução clonal é mais importante ou foram recentemente colonizadas. A hipótese de equilíbrio gamético, ou seja, cruzamento aleatório, foi testada para cada localidade individual usando 1000 simulações. O índice padronizado de desequilíbrio de ligação (\bar{r}_d) foi significativamente maior que zero (p-valor < 0.001) em 7 dos 12 locais amostrados indicando população clonal, gargalo genético, ou eventos de seleção natural (Tabela 5.2). A maioria das populações do cerrado possuem forte desequilíbrio de ligação, enquanto as populações ao do Paraná e o Maranhão estão em equilíbrio.

Tabela 5.2. Índice de associação, \bar{r}_d , como medida de desequilíbrio de ligação (LD) multilocus em diferentes localidades amostradas no Brasil. Piracicaba - SP, 2020.

Localidades amostradas	Índice de Associação (\bar{r}_d)	¹ p-valor
MABAI	0,0775	1
MTDIR	0,0833	0,001**
MTDIS	0,0289	0,001**
MTLVR	0,0415	1
MTLRR	0,0602	0,001**
MTNMS	0,0356	0,001**
MTSOS	0,0755	0,001**
MTSPR	0,0666	1
MTSRS	0,0871	0,001**
PRDVR	0,0356	1
PRPGR	0,0575	0,496
TOPAR	0,0175	0,001**

¹Valores significantes de p amostras que significativamente em desequilíbrio de ligação.

Índice de Fixação (F_{ST}) e distância genética

Os valores de F_{ST} calculados usando 4245 marcadores variaram de 0,0 a 0,16 indicando baixo a moderado grau de estruturação genética (Tabela 4.3). A localidade com maiores valores de F_{ST} foi MABAI, ao norte do país, enquanto a menos diferenciada foi MTDIR na região do Mato Grosso. Comparando as duas localidades do Paraná, PRPGR teve maiores valores de F_{ST} que PRDVR.

Tabela 5.3. Índice de fixação (F_{ST}) calculado par-a-par baseado em loci (triângulo superior) e p-valores (triângulo inferior). Piracicaba - SP, 2020.

	MABAI	MTDIR	MTDIS	MTLVR	MTLRR	MTNMS	MTSOS	MTSPR	MTSRS	PRDVR	PRPGR	TOPAR
MABAI		-0.46	0.05	0.08	0.07	0.07	0.16	0.05	0.11	-0.06	0.08	-0.02
MTDIR	1.00		-0.99	-0.63	-0.46	-0.70	-0.45	-0.53	-0.67	-0.61	-0.69	-0.89
MTDIS	0.01	1.00		0.02	0.05	-0.03	-0.08	-0.10	-0.06	-0.15	-0.01	0.04
MTLVR	0.00	1.00	0.02		0.10	-0.01	0.07	0.06	-0.07	0.01	0.11	0.06
MTLRR	0.00	1.00	0.00	0.00		0.07	0.10	-0.03	0.02	-0.07	0.05	0.07
MTNMS	0.00	1.00	0.44	0.06	0.00		-0.02	-0.05	-0.06	-0.10	0.02	0.03
MTSOS	0.00	1.00	0.95	0.00	0.00	0.18		0.06	-0.06	0.07	0.03	0.07
MTSPR	0.00	1.00	0.95	0.00	0.43	0.51	0.01		0.01	-0.05	-0.03	-0.12
MTSRS	0.00	1.00	0.87	0.76	0.02	0.72	0.63	0.07		-0.06	-0.02	0.01
PRDVR	0.64	1.00	0.99	0.02	0.82	0.94	0.01	0.41	0.51		-0.04	-0.14
PRPGR	0.00	1.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.32	0.19	0.52		0.05
TOPAR	0.20	1.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.96	0.06	1.00	0.00	

Teste de significância para determinar valores de zero foram baseados em 1,000 bootstraps.

A árvore não enraizada calculada pelo método UPMGA dá suporte ao que foi encontrado mostrando, baixo grau de estruturação genética e baixo grau de diferenciação entre os locais amostrados (Figura 5.5). Comparando as duas localidades do Paraná, PRPGR se mostrou mais estruturada se concentrando em 2 clusters, enquanto PRDVR esteve presente em 5 clusters.

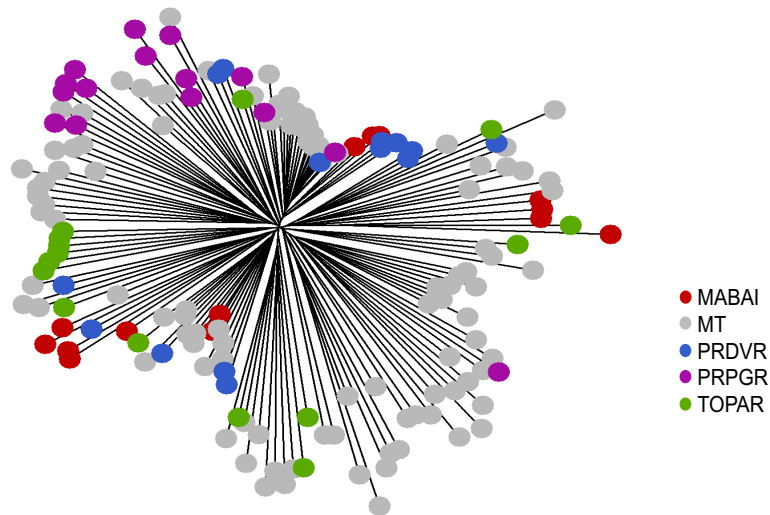


Figura 5.5. Árvore neighbour-joining (NJ) não enraizada calculada com base em 916 marcadores SNPs neutros para capim-amargoso (*Digitaria insularis*). As cores representam os diferentes locais de coletas. As localidades no Mato Grosso foram agrupadas em um único grupo (MT). Piracicaba - SP, 2020.

Magnitude e direção do fluxo gênico

O fluxo de migrantes para o capim-amargoso (*Digitaria insularis*) teve direcionalidade assimétrica e determinado por dois locais, PRDVR e MTDIR (Figura 5.6). PRDVR, no sul do Paraná, é a localidade que envia o maior número de migrantes e mais impacta a dinâmica de populacional de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) no Brasil. A segunda localidade com elevado impacto está no Mato Grosso, MTDIR, enviando migrantes para outras localidades no Mato Grosso, norte do Paraná, e Tocantins. Quatro localidades não estão fortemente conectadas com os outros locais amostrados (Figura 5.6).

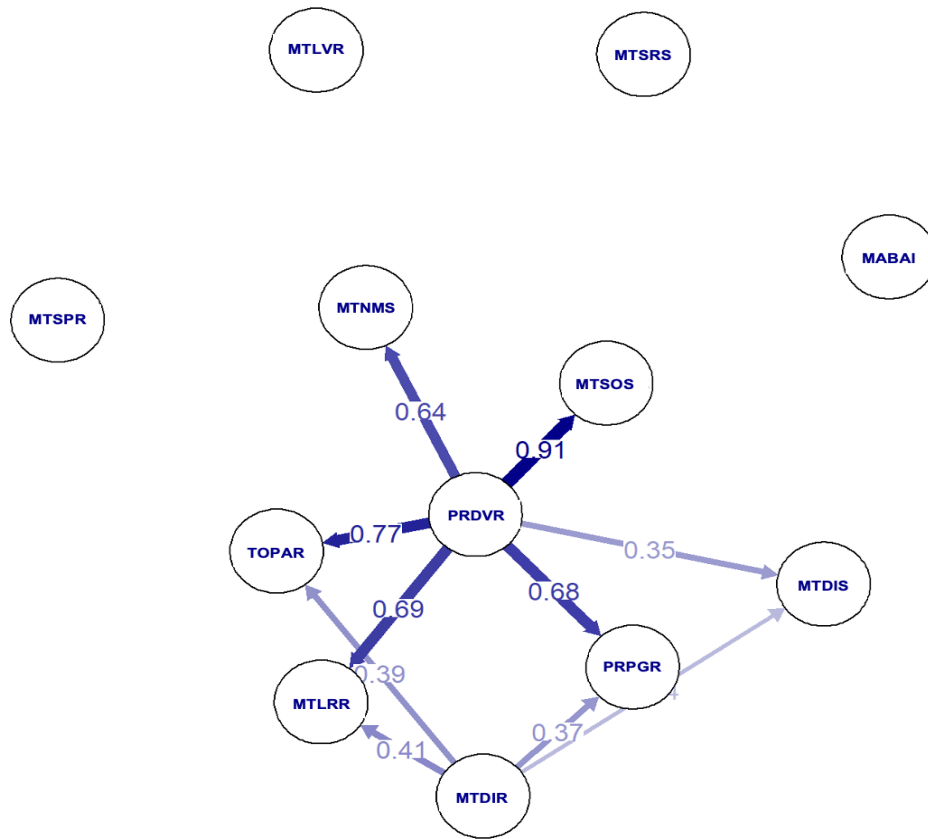


Figura 5.6. Direção e magnitude do fluxo de migrantes de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) usando G_{ST} . As flechas indicam a direção do fluxo gênico e o número mostra o coeficiente relativo de migração entre as populações amostradas. Flechas com maiores valores aparecem mais grossas e com coloração mais forte. (a) Rede baseada nos valores de migração relativa, mostrando apenas nos valores acima de 0.5. Piracicaba - SP, 2020.

Estrutura genética e seleção natural

Com base nos resultados obtidos nas análises com ADMIXTURE usando 1134 marcadores neutros indicam que $K = 3$ foi o número mais provável de clusters genéticos considerando os locais de amostragem e o teste de validação cruzada (cross validation) (Figura 5.7). Em geral, as populações se apresentam não diferenciadas com exceção de MABAI, PRDVR, MTLVR, que apresentaram maior grau de estruturação genética. Os resultados da análise de PCA não mostram significativa diferenciação entre os locais amostrados (Figure 5.6).

Os resultados nas análises usando 687 marcadores sob seleção positiva indicam um maior número de clusters genéticos ($K = 5$) (Figura 5.7), sendo eles: G1 (MTLRR e PRPGR), G2 (MABAI), G3 (MTLVR), G4 (MTDIS, MTNMS e MTSRS) e G5 (MTSPR e PRDVR), sendo que apenas o grupo G4 não é formado por indivíduos resistentes. Os resultados de PCA baseados nos marcadores de seleção positiva mostram leve estruturação, sendo que os grupos G2, G3 e G5 se sobrepõem e compõem uma das estruturas, G1 compõem uma segunda (ambas

com indivíduos considerados resistentes) e G4 compõem uma última estrutura somente com os indivíduos considerados suscetíveis ao herbicida glifosato (Figura 5.7).

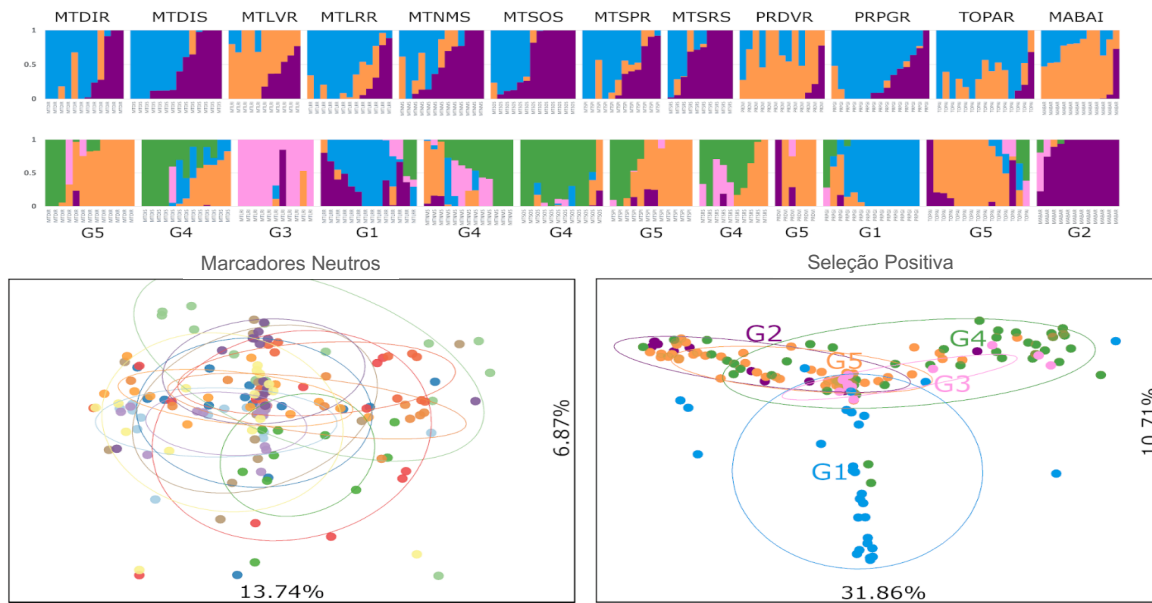


Figura 5.7. Análise de ADMIXTURE e PCA de 12 locais amostrados de capim-amargoso (*Digitaria insularis*). Análise de ADMIXTURE foi realizada com 1134 marcadores neutros (plot superior) com $K=3$ e 687 marcadores putativos em seleção positiva (plot inferior), com $K=5$. PCA também foram realizados com marcadores neutros (à esquerda) e marcadores putativos em seleção positiva (à direita). Grupos formados nas análises PCA (G1-G5) estão indicados na parte inferior do plot de ADMIXTURE. Piracicaba - SP, 2020.

5.4 Discussão

A observação dos níveis de divergência genética entre populações de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) e a análise da estrutura genética dessas populações permitiram a interpretação de um processo de adaptabilidade desta espécie não só à resistência ao herbicida glifosato em si, como da influência de todo desenvolvimento da cultura da soja nos últimos anos, especialmente após o advento da soja geneticamente modificada para resistência ao glifosato (Soja RR). Sabe-se que a cultura da soja RR foi lançada simultaneamente ao desbravamento de novas regiões brasileiras produtoras desse grão, especialmente no Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil. Tal fenômeno foi capitaneado por produtores sulistas, especialmente aqueles oriundos do Rio Grande do Sul e do Paraná, que levaram não só a cultura, mas também o manejo para uma região de maior temperatura média anual e de menor precipitação acumulada.

Este processo aconteceu ao mesmo tempo que a tecnologia do uso de glifosato “dentro da cultura” (Glifosato aplicado sobre a soja RR) foi sendo adotada, o que aumentou a pressão

de seleção de resistência ao herbicida glifosato, mas também melhorou o manejo de outras espécies de plantas daninhas problemáticas para cultura. Assim o capim-amargoso, ao lado da buva (*Conyza* spp.), tornou-se possivelmente a espécie mais favorecida na seleção entre biótipos (resistência) como também dentro da nova comunidade infestante que agora habita os campos de produção de grãos brasileiros da divisa com o Paraguai, no Paraná, até o Mato Grosso, Tocantins e Maranhão, como observou-se nos resultados aqui mostrados.

Contudo é importante pontuar nesse material situações muito peculiares que estes resultados elucidam para uma planta daninha como capim-amargoso. Pouco são os trabalhos desta natureza disponíveis na literatura nacional para plantas daninhas como um todo, logo algumas observações como a da Figura 5.5 suportam que há baixo grau de estruturação genética, baixo grau de diferenciação entre os locais amostrados e ainda que alguns clusters sejam observados, não há informação proveniente dessa análise que indique qualquer tipo de variação na espécie ou mesmo formação de sub-espécies ou cultivares. Isso garante que as amostras obtidas pertencem a mesma espécie, que ainda que seja natural das áreas, guarda grande similaridade gênica entre si.

Os resultados indicam elevado fluxo gênico entre as diversas regiões produtoras de soja do Brasil, sendo a estruturação genética considerada de baixa a moderada. As populações mais estruturadas estão ao sul (Paraná) e ao norte (Maranhão). O nível de estruturação citado pode ser explicado devido ao fato de que o capim-amargoso é uma espécie preferencialmente autógama, e uma vez que as características de resistência de um biótipo de planta daninha podem ser intrínsecas ao seu DNA, pode-se assumir que tais características podem ser herdáveis (WSSA, 1998).

Apesar de ser uma planta preferencialmente autógama, biótipos de capim-amargoso resistente e suscetível ao herbicida glifosato possuem diferenças em seu DNA em torno de 56,6%, caracterizando alta variação na sequência enzimática desta espécie (MARTINS, 2013), que pode ser explicada pelo fato do capim-amargoso ter também taxa de fecundação cruzada (FRAGA et al., 2016). Essa variabilidade genética pode implicar em diferenças morfológicas, fisiológicas e genéticas, podendo alterar significativamente sua capacidade de resistir a ação dos herbicidas.

Constatou-se que o fluxo gênico principal é direcional (sul para o norte) tendo como fonte de imigrantes a população de Dois Vizinhos (PRDVR) (Figura 5.6), população está que se encontra no sul do estado do Paraná próximo à divisa com o Paraguai, região onde foi encontrado o primeiro caso de capim-amargoso resistente ao glifosato, relatado em 2008 (HEAP, 2020). Esta população alimenta o fluxo genético da maioria das populações estudadas

sendo a fonte do alelo de resistência, o que oferece forte evidência para hipótese que após ter surgido no Paraguai, o alelo de resistência chegou ao Paraná e rapidamente foi distribuído para o centro-oeste.

Isto está provavelmente relacionado ao fato de muitos agricultores brasileiros do Paraná também cultivarem soja e milho nos campos paraguaios, o que resulta no trânsito frequente de máquinas, equipamentos e pessoas (LÓPEZ-OVEJERO et al. 2017). Essa situação em particular, bem como a dispersão de sementes em curtas distâncias pelo vento, pode ter levado os alelos resistentes para essas áreas.

A dispersão de sementes a longas distâncias pode ser possível através de canais de irrigação e chuva (NORSWORTHY et al., 2014), compra e venda de equipamentos de colheita usados, colhedoras que se deslocam pelo país (SCHWARTZ et al., 2016), sementes contaminadas e alimentação e transporte através da migração de animais selvagens (FARMER et al., 2017). Além de adotar medidas de prevenção como a limpeza dos equipamentos agrícolas, é difícil impedir a dispersão dessas sementes.

A forma como a cultura da soja vem ocupando o Brasil também é um indicativo de que o transporte de máquinas e pessoas levou este ramo do fluxo gênico da Figura 5.6 a áreas pouco coesas geograficamente como o Maranhão, o Tocantins e o Mato Grosso. A semeadura de soja na região do Paraná ocorre mais cedo do que no Centro-Oeste, visto que o regime hídrico da região Sul permite a semeadura da safrinha de milho após a cultura principal, no caso a soja. Quanto mais ao norte do Brasil nos deslocamos maior a tendência de que não exista safrinha, o que dá ao agricultor tempo para aguardar a definição do regime hídrico daquele ano, para proceder a semeadura da soja, com mais possibilidade de êxito quanto à disponibilidade hídrica. Assim, a sequência na janela de semeadura permite aos produtores escalonar o uso de maquinários, o que é um tipo de negócio em muitas áreas do país, levando ao deslocamento destas no sentido da região Centro-Oeste, Norte e Nordeste. A grande interação entre associação de produtores sulistas e áreas ao norte explica como o fluxo gênico do capim-amargoso pode dar saltos geográficos tão distintos.

Em contrapartida, as populações oriundas da região de Ponta Grossa, localizada ao sudeste do Paraná, é endogâmica, ou seja, tem pouco fluxo gênico com as outras áreas estudadas e é mais bem estruturada. Essas evidências corroboram com a hipótese de que os genes responsáveis pela resistência ao herbicida glifosato sejam oriundos da região Sul. O padrão encontrado corrobora com estudos de populações prévios que também encontraram estruturação genética no Paraná e baixa diferenciação na Região Sudeste (TAKANO et al., 2018). Uma segunda população importante com relação ao fluxo gênico é a população de

Diamantino, no Estado do Mato Grosso, que por razões similares aquelas já citadas, encontra-se na rota de maquinário que vem do Sul do país. Com relação as outras populações, elas têm pouca ou nenhuma conexão de migrantes, como observado na Figura 5.6.

Encontrou-se forte desequilíbrio de ligação para a maioria das populações do Centro-Oeste, indicando que os biótipos podem ter chegado aos locais oriundos de outras regiões, contudo em pequenas quantidades, levando estas populações a uma fração da variação genética total da população inicial, com alta endogamia, caracterizando um efeito fundador ou, pela própria ação do uso do glifosato sob uma população segregante, ter gerado um gargalo genético que originou o desequilíbrio de ligação da Figura 5.6, porém guardando a identidade inicial para justificar os clusters da Figura 5.7, que indicaram seleção positiva.

Pode-se considerar a seleção pelo uso intenso do glifosato como uma seleção natural que custou ao biótipo a perda de certas características selvagens que o ligariam a populações sulistas, mas que mais uma vez preservaram-se nos clusters ou processo de seleção natural. Obviamente existe a questão de que a maior parte das populações do Mato Grosso que ficaram desligadas dos biótipos sulistas, serem clones, o que sugeriria que a maior parte das populações do Mato Grosso vieram da mesma planta, exceto MTLVR e MTSPR que já tinham se mostrado diferentes também no gráfico de estrutura.

Isto se postula impossibilitado não só pela pouca capacidade de os rizomas sobreviverem após transporte e armazenamento nos maquinários, como pelo fato de que observamos este processo de forma semelhante para a planta daninha buva, que não possui propagação vegetativa. Adicionalmente, as duas populações oriundas do Estado do Paraná, Dois vizinhos e Ponta Grossa, que são mais próximas geograficamente, além da população do Maranhão, foram consideradas não clonais, evidenciando o fluxo gênico influenciado pela ação humana. Isto sugere que a maior parte das populações estudadas do Estado do Mato Grosso tem alguma ligação com as do Paraná e possivelmente foram recentemente colonizadas, como característica ecológica de dispersão, já que possuem baixo padrão de LD (Tabela 5.2).

Com o aumento do fluxo de sementes do sul para o norte do país e nas infestação de capim-amargoso em todas as localidades num gradiente em direção ao norte, é de se imaginar que uma planta, antes pouco frequente nos campos agriculturáveis e mais caracterizada por habitar as periferias destes, agora apresenta um aumento vertiginoso na pressão de infestação. Sem competição com outras daninhas mais agressivas que possam interferir no seu ciclo, devido a efetividade do herbicida glifosato no controle das mesmas, podem expressar o máximo de seu potencial fazendo com que a frequência inicial de resistência a herbicidas, que não só ao glifosato, seja alcançada com facilidade. Esta observação é validada quando se associa ao que

foi mostrado por MELO et al., (2016) e mais tarde comprovado por OLIVEIRA (2020) em trabalhos que identificaram biótipos de capim-amargoso resistentes a haloxifop em áreas de produção de soja convencional no Mato Grosso, na região de Rondonópolis.

O manejo de capim-amargoso com haloxifop é tão antigo quanto o próprio herbicida no Brasil e apenas em 2016 encontraram biótipos resistentes de capim-amargoso aos “fops”, o que indica que houve aumento de pressão de infestação da planta nas áreas e isso levou a seleção do biótipo resistente. O capim-amargoso além de ser resistente ao glifosato teve condições de produzir muito mais descendentes do que antes faria, visto que pela ação do glifosato, também não há competição interespecífica com outras espécies de plantas daninhas nas áreas, a não ser a cultura de soja RR, que ocupa os campos não mais do que 4 meses e tem baixa capacidade competitiva com o capim-amargoso. Após o gargalo genético imposto pela pressão de seleção do herbicida, o manejo da cultura não apresentou outros gargalos para a expansão desenfreada que o capim-amargoso demonstrou.

Tal aumento na disponibilidade de sementes da planta daninha capim-amargoso levou a planta a tantas localidades diferentes e devido ao uso do glifosato de forma tão intensa, seleções regionais de biótipos suscetíveis ocorreram, como indica o nível de LD com forte desequilíbrio de ligação para a maioria das populações do cerrado. Ainda que o capim-amargoso possua a capacidade de se reproduzir de forma assexuada através de rizomas, o fato de isso ocorrer apenas em algumas das populações do Cerrado, por si só, é uma comprovação da não plausibilidade da reprodução clonal.

Os principais fatores que contribuíram para a rápida disseminação do capim-amargoso no Brasil são aparentemente resultado da combinação de características biológicas das espécies, fatores relacionados ao manejo de plantas daninhas em cada região e ao aumento do uso de glifosato após a adoção da Soja Roundup Ready® (LÓPEZ-OVEJERO et al., 2017).

Considerando-se que o produtor, que não faz utilização de pré-emergente, faz no mínimo cinco aplicações de glifosato no ciclo da soja (dessecação, pré-semeadura, V₂, V₄-V₆, V₈) teremos ao longo de dez anos, no mínimo, cinquenta aplicações de pelo menos 720 gramas de equivalente ácido de glifosato por hectare, ou seja, exercendo assim uma pressão de seleção enorme.

A variabilidade genética natural existente em qualquer população de plantas daninhas é a responsável pela fonte inicial de resistência em uma população suscetível de plantas daninhas. Geralmente, as mutações gênicas que ocorrem em uma população suscetível que ainda não foi submetida a pressão de seleção pelo herbicida é resultante de variabilidade genética espontânea, não sendo, portanto, induzida pelo agente de seleção, ou seja, o herbicida. Todas as populações

de plantas daninhas, independentemente da aplicação de qualquer produto, provavelmente contêm plantas individuais (biótipos) que são resistentes a herbicidas (KISSMANN, 1996).

As taxas de mutação espontânea existente na natureza é que determinam a frequência inicial de um biótipo resistente de plantas daninhas (JASIENIUK; BRÛLÉ-BABEL; MORRISON, 1996). Uma taxa normal de mutação em organismos biológicos é frequentemente citada como sendo entre $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-6}$ gametas por loco por geração, quando a resistência é determinada por um gene nuclear, sendo este valor utilizado em modelos de predição de evolução de resistência de plantas daninhas a herbicidas (MAXWELL, 1992). O tipo de cruzamento entre as plantas, a densidade da planta daninha e se o gene é recessivo ou dominante influenciam marcadamente na probabilidade da frequência inicial do biótipo resistente (JASIENIUK; BRÛLÉ-BABEL; MORRISON, 1996).

Durante a disseminação da resistência, as mutações e seleções locais, o pólen de interpopulação, a dispersão de sementes e os eventos fundadores podem levar à estruturação espacial da variação genética na paisagem agrícola (OSUNA et al., 2011). Conseqüentemente, as análises da diversidade genética da população dentro e através de regiões geográficas geralmente fornecem informações sobre os caminhos e mecanismos de propagação da resistência (TSUJI et al., 2003; DÉLYE et al., 2010). Portanto, os dados deste estudo demonstram que a dispersão da resistência de capim-amargoso ao herbicida glifosato evoluiu através de fluxo gênico e também por seleções independentes. Análises para detectar marcadores putativos sob seleção natural encontraram um número significativo de marcadores sob seleção positiva (direcional) que estão possivelmente associados ao uso de herbicida glifosato.

5.5 Conclusões

A estruturação genética dessas populações de capim-amargoso, obtida por sequenciamento via biblioteca de GBS mostrou-se baixa a intermediária, evidenciando um fluxo gênico marcante do Sul para o Norte do Brasil, acompanhando a rota de maquinários ligadas a cultura da soja RR. Um forte processo de seleção associado ao uso do herbicida glifosato e do manejo da cultura da soja como um todo, está em curso estruturando as populações.

As populações coletadas em Balsas (MA) (MABAI), Lucas do Rio Verde (MT) (MTLVR), Sapezal (MT) (MTSPR) e Santa Rita do Trivelato (MT) (MTSRS), segregantes ou resistentes, foram selecionadas localmente ou sob biótipo de pouca correlação genética com o

Sul do Brasil. Os demais biótipos possuem estruturação genética suficiente para alegação de que migraram, ao menos parcialmente, do Paraguai para áreas no Brasil.

Referências

ADAMACK, A. T.; GRUBER, B. PopGenReport: simplifying basic population genetic analyses in R. **Methods in Ecology and Evolution**, v.5, n.4, p. 384–387, 2014.

AGAPOW, P.M.; BURT, A. Indices of multilocus linkage disequilibrium. **Molecular Ecology Notes**, v.1, n.2, p.101-102, 2001.

ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R.; FERNÁNDEZ-MORENO, P.T.; OZUNA, C.V.; ROJANO-DELGADO, A.M.; CRUZ-HIPOLITO, H.E.; DOMÍNGUEZ-VALENZUELA, J.A.; BARRO, F.; DE PRADO, R. Target and non-target site mechanisms developed by glyphosate-resistant hairy beggarticks (*Bidens pilosa* L.) populations from Mexico. **Frontiers in Plant Science**, v.7, n.1492, p.1-12, 2016.

BARROSO, A.A.M.; GALEANO, E.; ALBRECHT, A.J.P.; REIS, F.C.; VICTORIA-FILHO, R. Does sourgrass leaf anatomy influence glyphosate resistance? **Comunicata Scientiae**, v.6, n.4, p. 445-453, 2015.

BONNY, S. Genetically modified herbicide-tolerant crops, weeds, and herbicides: Overview and impact. **Environmental Management**, v.57, n.1, p.31-48, 2016.

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

CATCHEN, J.; HOHENLOHE, P. A.; BASSHAM, S.; AMORES, A.; CRESKO, W. A. Stacks: An analysis tool set for population genomics. **Molecular Ecology**, v.22, n.11, p.3124-3140, 2013.

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 XXII Congresso da Sociedad Española de Malherbologia / XIX Congresso da Asociación Latinoamericana de Malezas / II congress Iberoamericano de Ciência de las Malezas. Fundação Calouste Glubenkian. **Resumos**. Lisboa, Portugal, 2009.

DÉLYE C.; MICHEL S.; BÉRARD A.; CHAUVEL B.; BRUNEL D.; GUILLEMIN J.P.; DESSAINT, F.; LE CORRE, V. Geographical variation in resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase-inhibiting herbicides across the range of the arable weed *Alopecurus myosuroides* (black-grass). **New Phytologist**, v.186, n.4, p.1005–1017, 2010.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, n.1, p. 11-15, 1987.

DRAY, S.; DUFOUR, A.B. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. **Journal of Statistical Software**, v.22, n.4, p.1-20, 2007.

FARMER, J. A.; WEBB, E. B.; PIERCE, R. A.; BRADLEY, K. W. Evaluating the potential for weed seed dispersal based on waterfowl consumption and seed viability. **Pest Management Science**, v.73, n.12, p.2592–2603, 2017.

FOLL, M.; GAGGIOTTI, O. A Genome-Scan Method to Identify Selected Loci Appropriate for Both Dominant and Codominant Markers: A Bayesian Perspective. **Genetics**, v.180, n.2, p.977–993, 2008.

FRAGA, D.; SILVA, A.F.; GAZZIERO, D.; AGOSTINETTO, D.; KARAM, D.; VARGAS, L. Biologia e genética das plantas daninhas resistentes a herbicidas no Brasil. In: CHRISTOFFOLETI; NICOLAI (Coord.). **Aspectos da resistência de plantas daninhas a herbicida**. 4.ed. Piracicaba: HRAC-BR, 2016. p. 59-75.

GILO, E.G.; MENDONÇA, C.G.; SANTO, T.L.E.; TEODORO, P.E. Alternatives for chemical management of sourgrass. **Bioscience Journal**, v.32, n.4, p.881-889, 2016.

GREEN, J.M. The benefits of herbicide-tolerant crops. **Pest Management Science**, v.68, n.10, p.1323-1331, 2012.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of Population Genetics**. 3rd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates. 1997. 519 p.

HEAP, I. **International survey of resistant weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/in.asp>>. Acesso em: 10 abril 2020.

HOLT R.D.; HOCHBERG M.E. When is biological control evolutionarily stable (or is it?). **Ecology**, v.78, n.6, p.1673–1683, 1997.

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

JOMBART T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. **Bioinformatics**, v.24, n.11, p1403-1405, 2008.

JOMBART, T.; AHMED, I. Adegnet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. **Bioinformatics**, v.27, n.21, p.3070–3071, 2011.

KAMVAR, Z. N.; TABIMA, J. F.; GRÜNWARD, N. J. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/ or sexual reproduction. **PeerJ**, v.2, e281, p.1-14, 2014.

KISSMANN, K.G. **Resistência de plantas a herbicidas**. São Paulo: BASF, 1996, 33p.

LISCHER, H. E. L.; EXCOFFIER, L. PGDSpider: an automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. **Bioinformatics**, v.28, n.2, p.298–299, 2011.

LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; TAKANO, H.K.; NICOLAI, M.; FERREIRA, A.; MELO, M. S.C.; CAVENAGHI, A.L.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; OLIVEIRA, R.S. Frequency and dispersal of glyphosate-resistant sourgrass (*Digitaria insularis*) populations across Brazilian agricultural production areas. **Weed Science**, v.65, n.2, p.285-294, 2017.

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**, v.24, n.4, p.641-647, 2006.

MARTINS, J. F. **Aspectos ecofisiológicos e genético de biótipos de *Digitaria insularis* resistente e suscetível ao glyphosate**. 2013, 73 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

MARTINS, J.F.; BARROSO, A.A.M.; CARVALHO, L.B.; CESARIN, A.E.; AMARAL, C.L.; NEPOMUCENO, M.P.; DESIDÉRIO, J.A.; ALVES, P.L.C.A. Plant growth and genetic polymorphism in glyphosate-resistant sourgrass (*Digitaria insularis* L. Fedde). **Australian Journal Crop Science**, v.10, n.10, p.1466-1473, 2016.

MAXWELL, B.D. Predicting gene flow from herbicide resistant weeds in annual agriculture systems. **Bulletin Ecological Society of American Abstract**, v.73, p.264, 1992.

MELO, M. S. C.; ADORYAN, M. L.; OLIVEIRA, T. Resistência de Capim-amargoso ao herbicida haloxyfop-methyl em biótipos da região centro-oeste. In: XXX Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, 2016, Curitiba, PR. **Anais do XXX Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas**, 2016. p. 747-747.

NEI, M. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.70, n.12, p.3321–3323, 1973.

NEI, M. Genetic distance between populations. **The American Naturalist**, v.106, n.949, p.283-292, 1972.

NORSWORTHY, J. K.; GRIFFITH, G.; GRIFFIN, T.; BAGAVATHIANNAN, M.; GBUR, E. E. In-field movement of glyphosate-resistant palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) and its impact on cotton lint yield: evidence supporting a zero-threshold strategy. **Weed Science**, v.62, n.2, p.237–249, 2014.

OLIVEIRA, T. **Levantamento, dose resposta e manejo de biótipos de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) com potencial de resistência múltipla a herbicidas inibidores da EPSP'S e ACCase**. 2020, 70 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

OSUNA M.D.; OKADA M.; AHMD R.; FISCHER A.J.; JASIENUK M. Genetic diversity and spread of thiobencarb resistant early watergrass (*Echinochloa oryzoides*) in California. **Weed Science**, v.59, n.2, 195–201, 2011.

PÉREZ-FIGUEROA, A.; GARCÍA-PEREIRA, M. J.; SAURA, M.; ROLÁN-ALVAREZ, E.; CABALLERO, A. Comparing three different methods to detect selective loci using dominant markers. **Journal of Evolutionary Biology**, v.23, n.10, p.2267–2276, 2010.

POLAND, J.A.; BROWN, P.J.; SORRELLS, M. E.; JANNINK, J.-L. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. **Plos One**, v.7, n.2, p.1–8, 2012.

POWLES S.B.; YU, Q. Evolution in action: plant resistance to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, v.61, n.1, p.317-347, 2010.

- POWLES, S.B. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: Lessons to be learnt. **Pest Management Science**, v.64, n.4, p.360-365, 2008.
- ROCHETTE, N. C.; RIVERA-COLÓN, A. G.; CATCHEN, J. M. Stacks 2: analytical methods for paired-end sequencing improve RADseq-based population genomics. **Molecular Ecology**, v.0, n.0, p.1-18, 2019.
- SCHWARTZ, L. M.; NORSWORTHY, J. K.; YOUNG, B. G.; BRADLEY, K. W.; KRUGER, G. R.; DAVIS, V. M.; STECKEL, L. E.; WALSH, M. J. Tall waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) and palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) seed production and retention at soybean maturity. **Weed Technology**, v.30, n.1, p.284–290, 2016.
- TAKANO, H. K.; DE OLIVEIRA, R. S.; CONSTANTIN, J.; MANGOLIM, C. A.; MACHADO, M. DE F. P. S.; BEVILAQUA, M. R. R. Spread of glyphosate-resistant sourgrass (*Digitaria insularis*): Independent selections or merely propagule dissemination? **Weed Biology and Management**, v.18, n.1, p.50–59, 2018.
- TSUJI R.; FISCHER A.J.; YOSHINO M.; ROEL A.; HILL J.E.; YAMASUE Y. Herbicide-resistant late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*): similarity in morphological and amplified fragment length polymorphism traits. **Weed Science**, v.51, n.5, 740–747, 2003.
- VENCILL, W.K.; NICHOLS, R.L.; WEBSTER, T.M.; SOTERES, J.K.; MALLORY- SMITH, C.; BURGOS, N. R.; JOHNSON, W. G.; MCCLELLAND, M. R. Herbicide resistance: Toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops. **Weed Science**, v.60, n.SP1, p.2-30, 2012.
- WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. Resistance and tolerance definitions. **Weed Technology**, v.12, n.1, p.789, 1998.
- YANNICCARI, M.; VILA-AIUB, M.; ISTILART, C.; ACCIARESI, H.; CASTRO, A. M. Glyphosate resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) is associated with a fitness penalty. **Weed Science**, v.64, n.1, p.71-79, 2016.

6 CONCLUSÕES GERAIS

- (i) Comparando-se os biótipos suscetíveis de *D. insularis* com os padrões da literatura científica internacional e as médias de bulas, pôde-se concluir com segurança que a "base-line" de suscetibilidade entre as populações de capim-amargoso é de 960 g e.a. ha⁻¹ glifosato.
- (ii) Este trabalho demonstrou que a resistência de capim-amargoso ao glifosato no Brasil está presente em todas as regiões produtoras de soja avaliadas, com frequência de 22,5% do total das amostras avaliadas.
- (iii) A estruturação genética dessas populações de capim-amargoso, obtida por sequenciamento via biblioteca de GBS mostrou-se baixa, evidenciando um fluxo gênico marcante do Sul para o Norte do Brasil, acompanhando a rota de maquinários ligadas a cultura da soja RR. Um forte processo de seleção associado ao uso do herbicida glifosato e do manejo da cultura da soja como um todo, está em curso estruturando as populações.
- (iv) As populações coletadas em Balsas (MA) (MABAI), Lucas do Rio Verde (MT) (MTLVR), Sapezal (MT) (MTSPR) e Santa Rita do Trivelato (MT) (MTSRS), segregante ou resistentes, foram selecionadas localmente ou sob biótipo de pouca correlação genética com o Sul do Brasil. Os demais biótipos possuem estruturação genética suficiente para alegação de que migraram, ao menos parcialmente, do Paraguai para áreas no Brasil.