

HELLEN MARTINS DA SILVEIRA

CONFIRMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE *Digitaria insularis* RESISTENTE AO GLYPHOSATE

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S587c
2017
Silveira, Hellen Martins da, 1984-
Confirmação e caracterização fisiológica de *Digitaria insularis* resistente ao glyphosate / Hellen Martins da Silveira. – Viçosa, MG, 2017.
x, 39f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Tocio Sedyama.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Ervas daninhas. 2. *Digitaria insularis*. 3. Fisiologia vegetal. 4. Herbicida. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-graduação em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22 ed. 632.5

HELLEN MARTINS DA SILVEIRA

CONFIRMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE *Digitaria insularis* RESISTENTE AO GLYPHOSATE

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de julho de 2017.



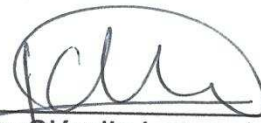
Daniel Valadão da Silva



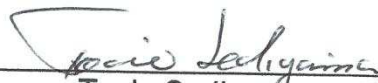
Ricardo Alcántara de la Cruz



Gustavo Antônio Mendes Pereira



Francisco Cláudio Lopes de Freitas
(Coorientador)



Tocio Sedyama
(Orientador)

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer”.

Mahatma Gandhi

“É na educação dos filhos que se revelam as virtudes dos pais”

*É com imenso prazer que agradeço aos meus pais **Wanderley J. M. Silveira** e **Clair Ap. Moraes Silveira**, e ao meu irmão **Victor J. M. Silveira** pela confiança e carinho aos meus estudos e sonhos, pois a caminhada foi longa e difícil, mas com perseverança e destreza pudemos juntos ultrapassar todas as barreiras colocadas nesta jornada.*

*Aos meus anjos enviados por Deus: meu amor, **Ricardo Alcântara de la Cruz** companheiro e pai do nosso maior tesouro, nossa filha **Helena**, que ainda não a conhecendo, já amamos incondicionalmente. Agradeço pelo carinho, ajuda e incentivo neste momento tão delicado.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, a *Deus*, pela fé, saúde e paz que faz da minha vida um ser humano conquistador e perseverante a cada etapa a ser seguida.

Ao meu orientador e segundo pai *Tocio Sedyama*, pela confiança, apoio acadêmico e amizade em minha trajetória acadêmica como pós-graduanda.

Aos meus coorientadores *Antonio Alberto da Silva* e *Francisco Cláudio Lopes de Freitas*, pela ajuda e apoio na realização deste trabalho.

A Prof^a, *Christiane Augusta Diniz Melo* pela participação na Qualificação e ao Prof. *Daniel Valadão da Silva* pela participação na defesa da Tese, agradeço a amizade e ajuda na correção deste trabalho.

Aos Pós-Doutorandos *Gustavo Antônio Mendes Pereira* e *Ricardo Alcântara de la Cruz* pela participação na defesa da Tese e apoio na correção deste trabalho.

Ao técnico e amigo *Luiz Henrique Lopes de Freitas*, pela incrível ajuda nos trabalhos realizados em casa de vegetação.

Em especial a minha amiga, *Ana Claudia Langaro*, pela amizade, conselhos e apoio na execução deste trabalho, além das confraternizações fora do ambiente de estudo.

Aos estagiários e amigos *Isadora, Elisa, Vitor, Camila, Cristiane, Maria Carolina* e *Roque* que fizeram do trabalho um ambiente de amizade e aprendizado.

Aos amigos da Equipe *Manejo Integrado de Plantas Daninhas* (MIPD) da UFV, pelo agradável convívio no laboratório, os quais direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, em especial aos amigos *Natalia Escobar, Yanna Costa, Rodrigo Cabral, Antônio Jr.* e *Alba Rocio*.

A Capes e ao CNPq pelo apoio à pesquisa e incentivo ao desenvolvimento científico estudantil.

A *Universidade Federal de Viçosa*, por estes 14 anos de aprendizados e conquistas, fazendo de mim uma pessoa repleta de vitórias e conhecimentos.

E, finalmente, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Hellen Martins da Silveira, filha de Wanderley José Martins da Silveira e Clair Aparecida de Moraes Silveira, nasceu em Rio das Pedras, no estado de São Paulo, Brasil, em 09 de julho de 1984. Em março de 2004 iniciou o curso de graduação em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Viçosa. Durante a graduação realizou um intercâmbio na Espanha em julho de 2007, retornando em outubro do mesmo ano, e também um estágio externo pela Empresa Iharabrás S/A Indústria Química, em julho até dezembro de 2009. Em janeiro de 2010 formou-se em Agronomia pela UFV. No mês de março a julho estudou como aluna especial da UFV e em agosto de 2010 iniciou o Mestrado em Fitotecnia, pela Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do professor Antonio Alberto da Silva, submetendo-se a defesa da dissertação no dia 16 de julho de 2012. Em agosto de 2012, iniciou mais um período como aluna especial até dezembro. Então, em agosto de 2013 foi selecionada para o doutorado na UFV sob orientação do professor Tocio Sedyama. Já em março de 2014, começou o Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Segurança do Trabalho também pela UFV, sendo concluído em março de 2016. Em 24 de junho de 2016 submeteu-se ao exame de qualificação do doutorado. No dia 24 de janeiro de 2017, uma suspeita é confirmada, está grávida. No dia 10 de junho de 2017, a descoberta de que será uma menina, chamada Helena foi revelada. Na data de 28 de julho de 2017, terminou mais uma etapa na área acadêmica, submetendo-se a defesa de Tese do doutorado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS	4
EFICÁCIA DO GLYPHOSATE EM BIÓTIPOS DE CAPIM-AMARGOSO COM INDÍCIO DE RESISTÊNCIA COLETADAS EM CULTIVOS RR	
RESUMO	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO.....	10
MATERIAL E MÉTODOS	11
Origem dos biótipos de capim-amargoso	11
Ensaio de dose-resposta.....	12
Análise estatística	12
RESULTADOS.....	13
DISCUSSÃO.....	16
CONCLUSÃO	18
REFERÊNCIAS	19
É POSSÍVEL IDENTIFICAR A RESISTÊNCIA DO CAPIM-AMARGOSO AO GLYPLOSATE NO CAMPO?	
RESUMO	23
ABSTRACT	24
INTRODUÇÃO.....	25
MATERIAL E MÉTODOS	26
Origem dos biótipos de capim-amargoso	26

Aplicações de glyphosate.....	27
Mensuração das características fisiológicas	27
Análise estatística	27
RESULTADOS.....	28
DISCUSSÃO.....	31
CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39

LISTA DE FIGURAS

Eficácia do glyphosate em biótipos de capim-amargoso com indício de resistência coletadas em cultivos RR

Figura 1. Porcentagem de controle dos biótipos de *Digitaria insularis* com indício de resistência MT, GO e BA comparada com o biótipo suscetível MG na dose de 720 (A) e 1440 (B) g ha⁻¹ do glyphosate avaliadas aos 7, 14 e 21 dias após aplicação. Barras verticais representam \pm desvio padrão (n=6). 14

Figura 2. Curvas log-logísticas dos biótipos de *Digitaria insularis* com suspeita da resistência ao glyphosate (GO, MT e BA) em comparação ao biótipo suscetível MG avaliados aos 21 dias após aplicação. (A) Curva dose-resposta em relação à percentagem de redução da matéria seca. (B) Curva dose-resposta em relação à percentagem de sobrevivência. Barras verticais representam o erro padrão (n= 6). ... 15

Figura 3. Plantas de biótipos de *Digitaria insularis*, em ensaios de dose-resposta, aos 21 dias após aplicação do glyphosate. Biótipo susceptível de MG (A). Biótipos com indício de resistência ao glyphosate BA (B), MT (C) e GO (D). 16

É possível identificar a resistência do capim-amargoso ao glyphosate no campo?

Figura 1. Taxa fotossintética (A), Concentração de CO₂ na câmara subestomática (B), Consumo de CO₂ (C) e a Razão interna e atmosférica de CO₂ (D), medida pelo IRGA na penúltima folha totalmente expandida dos biótipos de *Digitaria insularis* aos 7 dias após aplicação de glyphosate. Cada grupo de barras corresponde a uma dose. Diferentes letras diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. 29

Figura 2. Condutância estomática (A) Taxa transpiratória (B) e Eficiência do Uso da Água (C) medida pelo IRGA na penúltima folha totalmente expandida dos biótipos de *Digitaria insularis* aos 7 dias após aplicação de glyphosate. Cada grupo de barras corresponde a uma dose. Diferentes letras diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. 30

LISTA DE TABELAS

Eficácia do glyphosate em biótipos de capim-amargoso com indício de resistência coletadas em cultivos RR

Tabela 1. Parâmetros da equação sigmoidal utilizada para estimar os valores da GR_{50} e C_{50} dos biótipos de *Digitaria insularis*.....15

É possível identificar a resistência do capim-amargoso ao glyphosate no campo?

Tabela 1. Equação de regressão linear e coeficiente (R^2) dos parâmetros fisiológicos dos biótipos de *Digitaria insularis* medidos pelo IRGA aos 7 dias após aplicação do glyphosate.....31

RESUMO

SILVEIRA, Hellen Martins da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Confirmação e caracterização fisiológica de *Digitaria insularis* resistente ao glyphosate.** Orientador: Tocio Sedyama. Coorientadores: Antonio Alberto da Silva e Francisco Cláudio Lopes de Freitas.

Desde a introdução das culturas resistentes ao glyphosate, este herbicida tem sido aplicado repetidas vezes por ano numa mesma área e safra. Esta prática contribui para seleção de biótipos de plantas daninhas resistentes. Espécies como *Digitaria insularis*, que possuem grande capacidade de disseminação, podem infestar grandes áreas num curto período de tempo. Isto gera maior consumo de herbicidas e eleva os custos de produção das culturas. Assim, esta pesquisa consistiu na identificação e caracterização fisiológica de biótipos de *D. insularis* resistentes ao glyphosate. A eficácia do glyphosate foi avaliada em três biótipos de *D. insularis* (MT, BA e GO) com início de resistência (R) e um biótipo suscetível (S) como controle (MG), por meio de ensaios de dose-reposta, assim como as características fisiológicas (taxa fotossintética, consumo de CO₂, condutância estomática, taxa transpiratória e eficiência do uso da água) usando um analisador de gases infravermelho (IRGA), visando estabelecer padrões que permitissem discriminar a resistência de *D. insularis* ao glyphosate. Os biótipos de MG e GO foram caracterizados como suscetíveis ao glyphosate. Os biótipos MT e BA apresentaram elevado nível de resistência ao glyphosate com fatores de resistência que oscilaram entre 3,1 a 26,7, e o biótipo GO apresentou potencial para desenvolvê-la. A ordem de susceptibilidade ao glyphosate dos biótipos foi MG < GO < MT < BA. As maiores diferenças nas alterações fisiológicas em plantas de *D. insularis* foram observadas nas doses de 360 e 720 g ha⁻¹ do glyphosate. Nas doses de 1440 e 2880 g ha⁻¹, estas foram afetadas de forma semelhante. Concluiu-se que os biótipos de *D. insularis* de MG e GO são suscetíveis ao glyphosate; enquanto os de MT e BA são resistentes a este herbicida. Além disso, não foi possível estabelecer padrões fisiológicos que permitiram discriminar a resistência de plantas de *D. insularis* ao glyphosate usando o IRGA.

ABSTRACT

SILVEIRA, Hellen Martins da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Confirmation and physiological characterization of glyphosate resistant *Digitaria insularis***. Adviser: Tocio Sedyama. Co-advisers: Antonio Alberto da Silva and Francisco Cláudio Lopes de Freitas.

Since the introduction of glyphosate resistant crops, this herbicide has been applied repetitively per year in the same area and cropping season. This practice contributes to the selection of resistant weed biotypes. Species such as *Digitaria insularis*, which have great dissemination capacity, can infest large areas in a short period of time, leading to higher consumption of herbicides and high crop production costs. This research consisted in the identification and physiological characterization of glyphosate resistant *D. insularis* biotypes. The glyphosate efficacy was evaluated in three *D. insularis* biotypes (MT, BA and GO) with suspect of resistance (R) and one susceptible (S) biotype as control (MG), by means of dose-response assays, as well as their physiological characteristics (photosynthetic rate, gas exchange, stomatal conductance, transpiration rate and water use efficiency) using an infrared gas analyzer (IRGA), aiming to establish physiological patterns that allowed to discriminate the glyphosate resistance of *D. insularis*. The biotypes from MG and GO were characterized as being susceptible to glyphosate, meanwhile the MT and BA biotypes as being resistant to this herbicide. The two latter biotypes showed a high level of resistance to glyphosate with resistance factors ranging from 3.1 to 26.7, and the GO biotype presented potential to develop it. The glyphosate susceptibility ranking of the *D. insularis* biotypes was MG < GO < MT < BA. The greatest differences on the physiological alterations of *D. insularis* were observed at 360 and 720 g ha⁻¹ of glyphosate, meanwhile at 1440 and 2880 g ae ha⁻¹, these were similarly affected. It was concluded that the *D. insularis* biotypes MG and GO were susceptible to glyphosate, while the MT and BA biotypes as being resistant this herbicide. In addition, it was not possible to establish physiological patterns that allowed discriminating the resistance to glyphosate of *D. insularis* using IRGA.

INTRODUÇÃO GERAL

A agricultura é uma atividade importante para o desenvolvimento do Brasil, mas é afetada por fatores bióticos e abióticos reduzindo o rendimento das culturas. Um dos fatores bióticos com maior impacto na produtividade são as plantas daninhas (Oerke, 2006). Estas plantas competem com a cultura diretamente por luz, água e nutrientes (Pimentel et al., 2001). Além disso, causam danos indiretos dificultando os tratos culturais e são hospedeiras de pragas e doenças (Liebman et al., 2001). Na agricultura moderna, os herbicidas são a principal ferramenta para o controle de plantas daninhas (Davis e Frisvold, 2017).

A engenharia genética e o melhoramento convencional de plantas permitiram a introdução e comercialização de culturas resistentes a herbicidas (glyphosate; glufosinate; imidazolinonas; etc.) oferecendo vantagens significativas no controle de plantas daninhas (Green, 2012; Bonny, 2016). Estas culturas foram introduzidas em meados dos anos 90 e foram adotadas rapidamente pelos agricultores (Duke, 2015). No entanto, a utilização de culturas resistentes a herbicidas com um único modo de ação, associado à utilização incorreta da tecnologia (Lopez-Ovejero et al., 2014), causaram o rápido aparecimento de um grande número de plantas daninhas resistentes a estes herbicidas (Powles e Yu, 2010).

A resistência a um herbicida se deve à seleção de biótipos resistentes preexistentes que, devido à pressão de seleção exercida por repetidas aplicações de um mesmo herbicida ou mecanismo de ação, encontra condições para multiplicação (Vencill et al., 2012). De acordo com Heap (2014), a resistência aos herbicidas é devida a cinco mecanismos primários: 1) mutações na sequência de DNA, alterando a tradução de proteínas (sítio de ação), reduzindo a afinidade do herbicida; 2) metabolização da molécula do herbicida para substâncias não tóxicas; 3) absorção e/ou translocação reduzida do herbicida ao sítio de ação; 4) compartimentalização da molécula de herbicida em locais inativos da planta; e 5) a superexpressão do gene que traduz a proteína alvo (sítio de ação).

Atualmente são 480 casos únicos (espécie x sítio de ação) de resistência a herbicidas no mundo (Heap, 2017). No Brasil, desde que foi

reportada a primeira espécie resistente em 1993, até hoje já existem 46 casos de resistência, algumas delas com resistência múltipla (Heap, 2017). Os casos mais importantes de resistência são ao glyphosate. Este herbicida age inibindo a enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) responsável pela síntese de aminoácidos aromáticos essenciais (Duke, 2017).

No Brasil, o azevém (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) foi a primeira espécie identificada resistente ao glyphosate em 2003 no Sul do país (Roman et al., 2004). Em 2005, identificaram-se duas espécies de buva (*Conyza bonariensis* e *C. canadensis*) no estado de São Paulo (Moreira et al., 2007; Lamego e Vidal, 2008); em 2008, o capim-amargoso (*Digitaria insularis*) no estado do Paraná (Carvalho et al., 2011); em 2010, outra espécie de buva (*C. sumatrensis*) no estado do Paraná (Santos et al., 2014); em 2014, o capim-branco (*Chloris elata*) nos estados de São Paulo e Paraná (Brunharo et al., 2016), em 2015, o caruru-palmeri (*Amaranthus palmeri*) no estado de Mato Grosso (Carvalho et al., 2015); e em 2016, o pé-de-galinha (*Eleusine indica*) foi identificada no estado do Paraná (Takano et al., 2017).

Das espécies com resistência ao glyphosate no Brasil, o capim-amargoso tem sido o principal problema, devido à sua grande capacidade de sobreviver e multiplicar-se em ambientes dificultando seu controle (Machado et al., 2006). Ocorre em culturas perenes (café, citrus) e anuais (como, soja e milho) onde a aplicação de glyphosate é eficaz para outras, mas não para o capim-amargoso (Carvalho et al., 2011). Portanto, maiores esforços têm sido feitos na caracterização dos fatores envolvidos em sua resistência, dispersão e manejo (Carvalho et al., 2011, 2012; Barroso et al., 2015; Gilo et al., 2016; Martins et al., 2016; Lopez-Ovejero et al., 2017), constatando-se que a origem de biótipos resistentes desta espécie foi por eventos evolutivos independentes, mas sua dispersão por atividades antropogênicas, pois os primeiros biótipos resistentes identificados no Brasil procederam do Paraguai (Lopez-Ovejero et al., 2017).

O capim-amargoso (*Digitaria insularis* (L) Mez ex Ekman/Fedde) é uma planta daninha C₄ (Kissmann e Groth, 1997), cujo aproveitamento da luz solar e resposta fotossintética são maiores em condições ambientais de alta irradiância e temperatura elevada (Taiz e Zeiger, 2013). Esta espécie

apresenta insensibilidade ao fotoperíodo para seu florescimento, mas quanto maior é o fotoperíodo, mais rápida é a emissão da panícula e maior é o acúmulo de matéria seca por planta (Pyon et al., 1977; Machado et al., 2006).

O controle químico das plantas daninhas é essencial, porém falhas de controle podem ocorrer particularmente observando se a causa foi decorrente da seleção de resistência ao herbicida na população (R4P Network, 2016). Técnicas para identificar e caracterizar a resistência a herbicidas torna-se vital nessas situações (Burgos et al., 2013). Métodos eficazes foram desenvolvidos para caracterizar a resistência a herbicidas tais como ensaios de: planta inteira, placa de Petri, atividade enzimática e biologia molecular relacionados ao sítio de ação (target-site). No entanto, sua aplicação está restrita a laboratórios e/ou instituições de pesquisa especializadas, e ainda é difícil discriminar a resistência no campo durante o controle químico de plantas daninhas na mesma safra (Zhang et al., 2016).

A fluorescência da clorofila vem sendo utilizada eficientemente para a detecção de resistência aos herbicidas inibidores do fotossistema II (FSII), da acetil-CoA carboxilase (ACCase), da acetolactato sintase (ALS), da protoporfirinogênio oxidase (PPO), glutamina sintetase (GS) e biossíntese de carotenoides por meio de fluorômetros de clorofila (Zhang et al., 2016). Os primeiros efeitos do glyphosate estão relacionados com a fotossíntese (Gomes et al., 2017; Zobiole et al., 2010). A taxa fotossintética e condutância estomática, mensuradas com um analisador de gás infravermelho (IRGA), apresentaram diferenças entre plantas de *Lolium perenne* resistentes e susceptíveis ao glyphosate, durante os primeiros 7 dias após a aplicação do herbicida (Yannicari et al., 2012). No entanto, avaliar estes parâmetros a campo é inviável durante este período, porque as densidades de população de plantas daninhas são maiores que a cultura (Andrew et al., 2015).

Dada à importância do uso do glyphosate em culturas RR e outros sistemas de cultivo, neste trabalho foi avaliada a eficácia do glyphosate em biótipos de capim-amargoso com indício de resistência por meio de ensaio dose-resposta. Além disso, foram identificadas as principais mudanças fisiológicas que ocorrem nas plantas sensíveis e resistentes ao glyphosate quando pulverizadas com esse herbicida.

REFERÊNCIAS

Andrew, I. K. S., Storkey, J., Sparkes, D. L. A review of the potencial for competitive cereal cultivars as a tool in integrated weed management. **Weed Research**, 55: 239-248, 2015.

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**, 6: 445–453, 2015.

Brunharo, C. A. C. G., Patterson, E. L., Carrijo, D. R., Melo, M. S. C., Nicolai, M., Gaines, T. A., Nissen S. J., Christoffoleti, P. J. Confirmation and mechanism of glyphosate resistance in tall windmill grass (*Chloris elata*) from Brazil. **Pest Management Science**, 72: 1758–1764, 2016.

Bonny, S. Genetically modified herbicide-tolerant crops, weeds, and herbicides: Overview and impact. **Environmental Management**, 57: 31–48, 2016.

Burgos, N. R., Tranel, P. J., Streibig, J. C., Davis, V. M., Shaner, D., Norsworthy, J. K., Ritz, C. Confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. **Weed Science**, 61: 4–20, 2013.

Carvalho, L. B., Alves, P., González-Torralva, F., Cruz-Hipólito, H. E., Rojano-Delgado, A. M., De Prado, R., Gil-Humanes, J., Barro, F., Luque de Castro, M. D. Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 60: 615–622, 2012.

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**, 59: 171–176, 2011.

Carvalho, L. B., Bianco, S., Pitelli, R. A., Bianco, M. S. Estudo comparativo do acúmulo de massa seca e macronutrientes por plantas de milho var. BR-106 e *Brachiaria plantaginea*. **Planta Daninha**, 25: 293–301, 2007.

Carvalho, S. J. P., Gonçalves Netto, A., Nicolai, M., Cavenaghi, A. L., López-Ovejero, R. F., Christoffoleti, P. J. Detection of glyphosate-resistant palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) in agricultural areas of Mato Grosso, Brazil. **Planta Daninha**, 33: 579–586, 2015.

Davis, A. S., Frisvold, G. Are herbicides a once in a century method of weed control? **Pest Management Science**, doi: 10.1002/ps.4643, 2017.

Duke, S. O. Perspectives on transgenic, herbicide-tolerant crops in the United States almost 20 years after introduction. **Pest Management Science**, 71: 652–657, 2015.

Duke, S. O. The history and current status of glyphosate. **Pest Management Science**, doi: 10.1002/ps.4652, 2017.

Gilo, E. G., Mendonça, C. G., Santo, T. L. E., Teodoro, P. E. Alternatives for chemical management of sourgrass. **Bioscience Journal** 32: 881–889, 2016.

Gomes, M. P., Le Manach'h, S. G., Hénault-Ethier, L., Labrecque, M., Lucotte, M., Juneau, P. Glyphosate-dependent inhibition of photosynthesis in willow. **Frontiers in Plant Science**, 8: 207, 2017.

Green, J. M. The benefits of herbicide-tolerant crops. **Pest Management Science**, 68: 1323-1331, 2012.

Heap, I. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponível em: <<http://www.weedscience.com>>. Acessado em 04 de julho de 2017.

Heap, I. Global perspective of herbicide-resistant weeds. **Pest Management Science**, 70: 1306–1315, 2014.

Kissmann, K. G., Groth, D. Plantas infestantes e nocivas. 2 ed. São Paulo: BASF. Tomo I. Plantas inferiores e monocotiledôneas, 825 p. 1997.

Lamego, F. P., Vidal, R. A. Resistência ao glyphosate em biótipos de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Planta Daninha**, 26: 467–471, 2008.

Liebman, M., Molher, C., Staver, C. Ecological management of agricultural weeds. Cambridge: Cambridge University Press. 544 p. 2001.

Lopez-Ovejero, R. F., Ferreira, A. C., Vrivellari, A., Braga, D. P. V. Culturas geneticamente modificadas tolerantes a herbicidas. In: Monquero, P. A. (Ed.) *Aspectos da biologia e manejo de plantas daninhas* (287–306). São Paulo: RiMa Editora, 2014.

Lopez-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**, 65: 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**, 24: 641–647, 2006.

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**, 10: 1466–1473, 2016.

Moreira, M. S., Nicolai, M., Carvalho, S. J. P., Christoffoleti, P. J. Resistência de *Conyza canadensis* e *Conyza bonariensis* ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, 25: 157–164, 2007.

Oerke, E. C. Centenary review crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, 144: 31–43. 2006.

Pimentel, D., McNair, S., Janecka, J., Wightman, J., Simmonds, C., O'Connell, C., Wong, E., Russel, L., Zern, J., Aquino, T., Tsomondo, T. Economic and environmental threats of alien plant, animal, and microbe invasions. **Agriculture Ecosystem and Environment**, 84: 1–20, 2001.

Powles S. B., Yu, Q. Evolution in action: plant resistance to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, 61: 317–347, 2010.

Pyon, J. Y., Whitney, A. S., Nishimoto, R. K. Biology of sourgrass and its competition with buffelgrass and guineagrass. **Weed Science**, 25: 171–174, 1977.

Roman, E. S., Vargas, L., Rizzardi, M. A., Mattei, R. W. Resistência de Azevém (*Lolium multiflorum*) ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, 22: 301–306, 2004.

R4P Network. Trends and challenges in pesticide resistance detection. **Trends in Plant Science** 21: 834–853, 2016.

Santos, G. Oliveira Jr., R. S., Constantin, J., Francischini, A. C., Machado, M. F. P. S, Mangolin, C. A., Nakajima, J. N. *Conyza sumatrensis*: A new weed species resistant to glyphosate in the Americas. **Weed Biology and Management**, 14: 106-114, 2014.

Taiz, L.; Zeiger, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª edição. Porto Alegre: Artemed. 954p. 2013.

Takano, H. K., Oliveira Jr., R. S., Constantin, J., Bras, G. B. P., Gheno, E. A. Goosegrass resistant to glyphosate in Brazil. **Planta Daninha**, 35: 1-9, 2017.

Vencill, W. K., Nichols, R. L., Webster, T. M., Soteris, 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**, 60(sp1): 2–30, 2012.

Yannicari, M., Tambussi, E., Istilart, C., Castro, A. M. Glyphosate effects on gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of two *Lolium perenne* L. biotypes with differential herbicide sensitivity. **Plant Physiology and Biochemistry**, 57: 210–217, 2012.

Zhang, C. J., Lim, S. H., Kim, J. W., Nah, G., Fischer, A., Kim, D. S. Leaf chlorophyll fluorescence discriminates herbicide resistance in *Echinochloa* species. **Weed Research**, 56: 424–433, 2016.

Zobiole, L. H. S., Oliveira Jr., R. S., Kremer, R. J., Constantin, J., Bonato, C. M., Muniz, A. S. Water use efficiency and photosynthesis of glyphosate-resistant soybean as affected by glyphosate. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 97: 182–193. 2010.

EFICÁCIA DO GLYPHOSATE EM BIÓTIPOS DE CAPIM-AMARGOSO COM INDÍCIO DE RESISTÊNCIA COLETADAS EM CULTIVOS RR

RESUMO - No Brasil, as infestações de áreas agrícolas com biótipos de capim-amargoso (*Digitaria insularis* (L) Mez ex Ekman/Fedde) resistentes ao glyphosate, resultam em aumento nos custos de produção das culturas. Avaliou-se a eficácia do glyphosate em três biótipos de capim-amargoso com índice de resistência (GO, BA e MT) ao glyphosate e um biótipo suscetível (MG) como controle. As plantas de cada biótipo de capim-amargoso foram tratadas com as seguintes doses de glyphosate: 0, 180, 360, 540, 720, 1440, 2880, 5760, 8640 e 11520 g ha⁻¹. Constatou-se que os biótipos MG e GO foram suscetíveis ao herbicida (controle > 90%). O biótipo MG apresentou redução do crescimento e mortalidade em 50% (GR₅₀ e C₅₀, respectivamente) nas doses de glyphosate de 243,7 e 431,6 g ha⁻¹. Os fatores de resistência dos biótipos com índice de resistência oscilaram entre 2,8 a 6,1 em relação ao GR₅₀; e entre 1,4 e ≥ 26,7 em relação ao C₅₀. A ordem de susceptibilidade dos biótipos de capim-amargoso foi MG < GO < MT < BA. Conclui-se que os biótipos de MT e BA apresentaram elevado nível de resistência ao glyphosate, e o biótipo de GO têm potencial para desenvolvê-la.

PALAVRAS-CHAVE: *Digitaria insularis*, dose-resposta, fator de resistência, herbicida.

GLYPHOSATE EFFICACY ON SOURGRASS BIOTYPES WITH SUSPECTED RESISTANCE COLLECTED IN GR-CROP FIELDS

ABSTRACT – In Brazil, infestations of crop areas with glyphosate-resistant sourgrass (*Digitaria insularis* (L.) Mez ex Ekman/Fedde) biotypes has risen significantly, increasing crop production costs. Glyphosate efficacy on three biotypes (GO, BA and MT) of sourgrass with suspected resistance was evaluated. A susceptible biotype (MG) was used as the control. The plants of each sourgrass biotype were sprayed with the following doses of glyphosate: 0, 180, 360, 540, 720, 1440, 2880, 5760, 8640 e 11520 g ae ha⁻¹. The results confirmed that the MG and GO biotypes were susceptible to glyphosate (control > 90%). The MG biotype exhibited growth reduction and mortality by 50% (GR₅₀ and LD₅₀, respectively) with mean glyphosate doses of 243.7 and 431.6 g ae ha⁻¹. The resistance factors of the biotypes with suspected resistance ranged from 2.8 to 6.1 in relation to GR₅₀ and from 1.4 to 26.7 in relation to LD₅₀. The glyphosate susceptibility ranking of the sourgrass biotypes was MG < GO < MT < BA. The MT and BA biotypes demonstrated high glyphosate resistance levels, and the GO biotype had a high potential to develop resistance.

KEYWORDS: *Digitaria insularis*, dose-response, herbicide, resistance factor.

INTRODUÇÃO

Capim-amargoso (*Digitaria insularis* (L.) Mez ex Ekman/Fedde) é uma espécie nativa de regiões tropicais e subtropicais da América. Frequentemente encontrado em pastagens, cafezais, pomares e áreas ruderais, como beira de estradas e terrenos baldios (Machado et al., 2008). É uma planta daninha de crescimento inicial lento, principalmente em condições de sombreamento ou de baixas temperaturas (Machado et al., 2006). Entretanto, sua rápida adaptação permite sobrevivência em diferentes condições ambientais, limitando o crescimento de outras espécies (Brighenti & Oliveira, 2011). Em algumas áreas agrícolas do Centro-Sul brasileiro, as populações adultas dessa espécie têm exigido doses ainda maiores de glyphosate sem sucesso no controle (Correia & Durigan, 2009). O glyphosate é o principal herbicida usado para o controle de plantas daninhas nessa região.

O glyphosate (N-fosfometilglicina) é um herbicida sistêmico não seletivo usado amplamente para o controle de plantas daninhas desde 1974 (Orcaray, Zulet, Zabalza & Royuela, 2012; Székács & Darvas, 2012). Este herbicida atua inibindo a enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetase (EPSPS), resultando no acúmulo de ácido shiquímico e na redução da biossíntese de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) nas plantas sensíveis (Duke & Powles, 2008). O glyphosate reduz rapidamente a atividade fotossintética (Duke, Baerson & Rimando, 2003). É translocado com fotoassimilados das folhas para o tecido meristemático até alcançar o local-alvo, atingindo a absorção máxima 96 horas após o tratamento (Cruz-Hipolito et al., 2011).

A expansão de áreas agrícolas no Brasil Central com culturas resistentes ao glyphosate (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 glyphosate nas culturas RR, promovendo a seleção de plantas daninhas resistentes (Yanniccari, Vila-Aiub, Istilart, Acciaresi & Castro, 2016). A resistência aos herbicidas ocorre quando as plantas daninhas sobrevivem, completam seu ciclo de vida e reproduzem-se por sementes 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, 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).

Por mais de 20 anos não houve relatos de resistência de plantas daninhas ao glyphosate (Székács & Darvas, 2012). No entanto, o primeiro caso de resistência registrado foi em 1996 em *Lolium rigidum*, em um campo na Austrália (Heap, 2017). Até o momento, há 37 espécies de plantas daninhas resistentes ao glyphosate. Em 2005, o primeiro relato sobre um biótipo de capim-amargoso resistente ao glyphosate, ocorreu no Paraguai. Posteriormente, em 2008, no estado do Paraná, também foi identificado como resistente ao glyphosate em campos de soja e milho (Heap, 2017). Desde então, o número de casos de capim-amargoso resistente foi aumentando consideravelmente no país (Cerdeira, Gazziero, Duke & Matallo, 2011). A rápida adoção de culturas RR e a perda da patente do glyphosate pela Monsanto em 2000 foram fatores decisivos para sua ampla adoção e uso como principal ferramenta no controle de plantas daninhas (Duke & Powles, 2008).

Dada à importância do uso do glyphosate em culturas RR e outros sistemas de cultivo, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do glyphosate em três biótipos de capim-amargoso com indício de resistência, coletados em lavouras de culturas RR de diferentes estados brasileiros, em comparação com um biótipo sensível mediante ensaios de dose-resposta.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem dos biótipos de capim-amargoso

Sementes de três biótipos com indício de resistência (R) ao glyphosate foram coletadas em regiões produtoras de milho e soja RR das cidades de Correntina – Bahia (13°20'36"S, 44°38'12"W), Bom Jesus – Goiás (18°12'11"S, 49°44'3"W), e Confresa - Mato Grosso (10°38'38"S, 51°34'08"W), nomeados BA, GO e MT, respectivamente. As sementes foram

colhidas de plantas que sobreviveram a uma aplicação de glyphosate de 1440 g ha⁻¹. As sementes de um biótipo suscetível (S) utilizado como controle foi coletado em Viçosa - Minas Gerais (MG) (20°45'14"S, 42°52'55"W), em uma área que não apresentava histórico de aplicação do herbicida.

Ensaio de dose-resposta

As sementes foram semeadas em bandejas de poliestireno preenchidas com substrato (Tropstrato HT – Vida Verde Indústria) em casa de vegetação. Após a germinação, as plântulas foram transplantadas individualmente para vasos de 300 cm³ preenchidos com substrato e areia (1:1). As plantas de cada biótipo de capim-amargoso foram tratadas no estágio de três a quatro folhas com as seguintes doses de glyphosate (Roundup Original, 360 g L⁻¹; Monsanto, Brasil): 0, 180, 360, 540, 720, 1440, 2880, 5760, 8640 e 11520 g ha⁻¹. As aplicações de glyphosate foram feitas utilizando um pulverizador costal pressurizado a CO₂, equipado com ponta de pulverização do tipo leque 110.015, calibrado para aplicar 150 L ha⁻¹ de calda.

Aos 7, 14 e 21 dias após aplicação (DAA) foram realizadas avaliações visuais de controle das plantas daninhas tratadas com glyphosate nas doses de 720 e 1440 g ha⁻¹, utilizando uma escala de classificação percentual, em que zero corresponde a nenhum dano e 100% a morte da planta. Aos 21 DAA, a mortalidade dos biótipos foi quantificada. A parte aérea das plantas foram colhidas ao nível do solo e colocadas individualmente em sacos de papel. As amostras foram secas em estufa com circulação forçada de ar por 72 horas e pesadas para determinar a matéria seca (MS). O experimento foi organizado de forma aleatória com seis repetições por dose e foi repetido novamente.

Análise estatística

Os dados da matéria seca e da mortalidade foram transformados em percentagem em comparação com plantas de controle não tratadas. A análise de regressão não linear foi utilizada para determinar a dose média que causou a redução do crescimento e mortalidade em 50% (GR₅₀ e C₅₀,

respectivamente). Um modelo log-logístico de quatro parâmetros foi conduzido usando o pacote estatístico drc (Ritz, Baty, Streibig & Gerhard, 2015) do programa R versão 3.2.5. O modelo estatístico é:

$$Y = c + \frac{d - c}{1 + \left(\frac{x}{g}\right)^b}$$

Onde, c e d são coeficientes correspondentes aos limites superior e inferior da curva, b é a inclinação da linha, g é o ponto médio de inflexão entre a parte superior e inferior da assíntota (este ponto corresponde ao GR₅₀ ou C₅₀), e x é a variável independente (corresponde as doses de glyphosate). Os dados foram plotados utilizando o software SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., EUA).

Os dados de avaliações visuais aos 7, 14 e 21 dias após aplicação do glyphosate, foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando necessário, as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram conduzidas usando o programa Statistix 9.0 (Analytical Software, EUA).

RESULTADOS

Nas avaliações visualizadas aos 7 DAA, na dose de 720 g ha⁻¹ de glyphosate, o nível de controle das plantas daninhas foi superior a 70% para o biótipo suscetível MG, enquanto que para os biótipos de MT, BA e GO exibiram menos de 5% de controle. Para a mesma dose, aos 14 e 21 DAA, observou-se um controle de 97 e 100%, respectivamente, para o biótipo de MG. O biótipo R de GO mostrou controle superior a 85% aos 14 DAA, sugerindo que este não é resistente ao glyphosate. A sobrevivência dos outros biótipos R de MT e BA o controle foi inferior a 20%, aos 14 e 21 DAA (**Figura 1A**).

Resultados semelhantes foram observados na dose de 1440 g ha⁻¹ do glyphosate. O biótipo MG teve controle maior que 60% aos 7 DAA, enquanto que não excedeu a 10% para os biótipos R de MT, BA e GO. Já aos 21 DAA, observou controle superior a 95% para os biótipos de MG e GO, enquanto que foi inferior a 24% para os biótipos de MT e BA (**Figura 1B**).

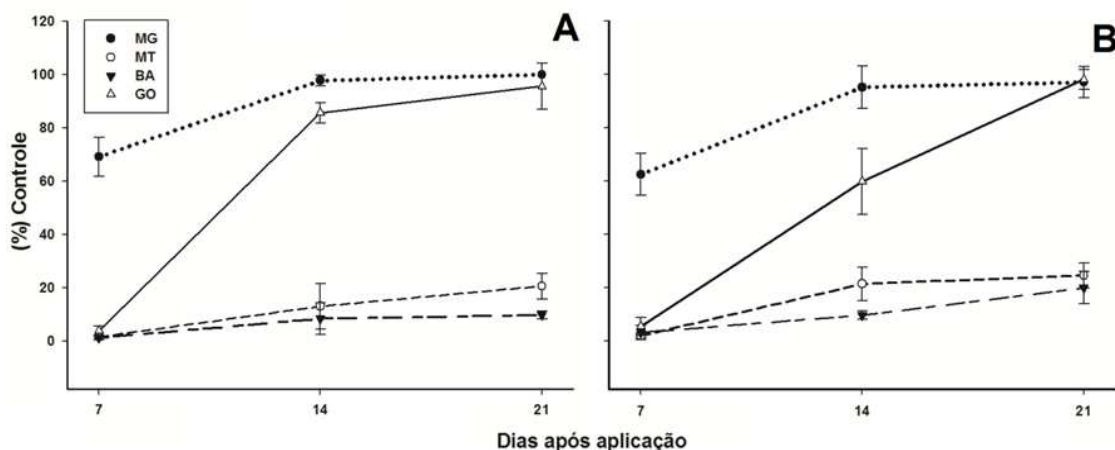


Figura 1. Porcentagem de controle dos biótipos de *Digitaria insularis* com índice de resistência MT, GO e BA comparada com o biótipo suscetível MG na dose de 720 (A) e 1440 (B) g ha⁻¹ do glyphosate avaliadas aos 7, 14 e 21 dias após aplicação. Barras verticais representam \pm desvio padrão (n=6).

O experimento de dose-resposta com glyphosate mostraram diferenças significativas entre os biótipos de capim-amargoso (baseados nos intervalos de confiança), confirmando a resistência dos biótipos de BA e MT. O GR₅₀ (dose necessária para reduzir 50% da matéria seca) estimado para o biótipo S de MG foi de 243,7 g ha⁻¹. Os fatores de resistência (FR) para os biótipos R foram de 3,1 e 6,1 (**Figura 2A, Tabela 1**).

Em relação à mortalidade, a dose necessária para controlar 50% das plantas (C₅₀) foi de 431,6 g ha⁻¹ para o biótipo S de MG. Na dose máxima (11520 g ha⁻¹) avaliada, o biótipo de MT apresentou maior mortalidade que o biótipo de BA; entretanto, ambos apresentaram sobrevivência superior a 50%. Portanto, não foi possível estimar a C₅₀ para estes biótipos. A estimativa da C₅₀ para o biótipo de GO foi de 605,9 g ha⁻¹, ou seja, 1,4 vezes maior que ao biótipo de MG (**Figura 2B, Tabela 1**). No entanto, o biótipo GO apresentou falhas de controle das plantas daninhas em doses superiores a 720 g ha⁻¹ (**Figura 3**).

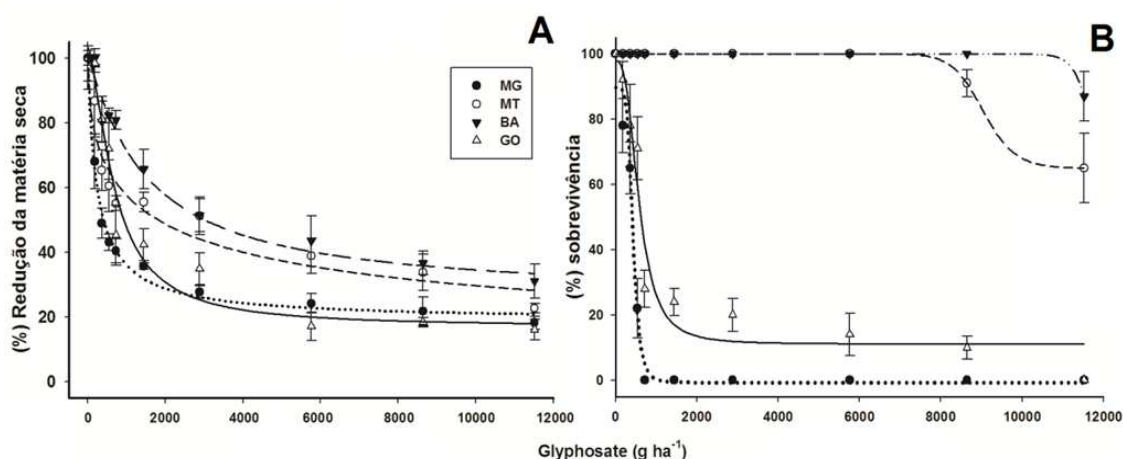


Figura 2. Curvas log-logísticas dos biótipos de *Digitaria insularis* com suspeita da resistência ao glyphosate (GO, MT e BA) em comparação ao biótipo suscetível MG avaliados aos 21 dias após aplicação. (A) Curva dose-resposta em relação à percentagem de redução da matéria seca. (B) Curva dose-resposta em relação à percentagem de sobrevivência. Barras verticais representam o erro padrão ($n=6$).

Tabela 1. Parâmetros da equação sigmoideal utilizada para estimar os valores da GR_{50} e C_{50} dos biótipos de *Digitaria insularis*.

Biótipos	c	D	b	R^2_{aj}	Dose ($g\ ha^{-1}$) (95% IC)	FR
Parâmetros do valor da GR_{50}						
MG (S)	18,74	100,05	0,930	0,95	243,7 (169,7; 317,7)	
MT (R)	18,86	101,05	0,709	0,91	756,8 (140,0; 1373,6)	3,1
BA (R)	25,79	101,27	1,067	0,94	1492,2 (793,1; 2191,2)	6,1
GO (R)	16,91	103,35	1,539	0,93	679,8 (553,6; 806,1)	2,8
Parâmetros do valor da C_{50}						
MG (S)	0,85	89,75	5,17	0,96	431,6 (408,4; 454,8)	
MT (R)	-	-	-	-	>11520	> 26,7
BA (R)	-	-	-	-	>11520	> 26,7
GO (R)	5,88	101,28	1,93	0,92	605,9 (540,7; 671,1)	1,40

c= limite inferior; d= limite superior; b= declividade da curva; $R^2_{aj}=1 -$ (soma dos quadrados da regressão/soma dos quadrados total corrigido); C_{50} = dose necessária para obter 50% de controle; GR_{50} = dose necessária para obter 50% de redução de matéria seca; FR= fator de resistência expresso pela relação entre $C_{50}(R)/C_{50}(S)$ ou $GR_{50}(R)/GR_{50}(S)$ e IC= Intervalo de Confiança ($n=6$).

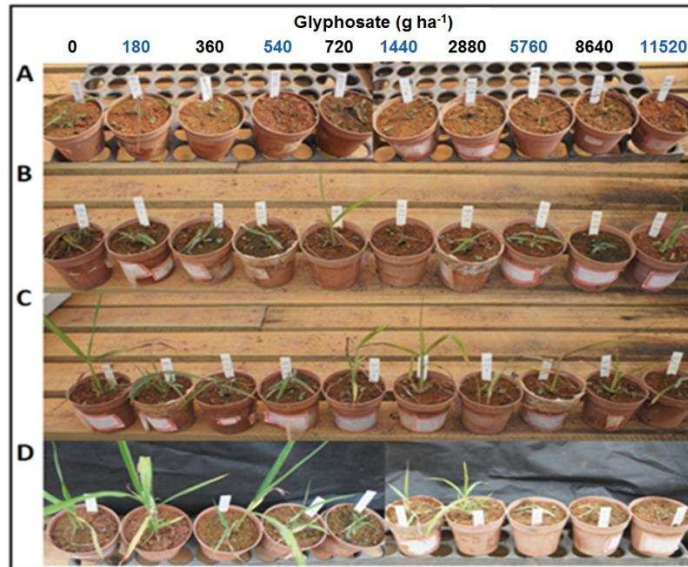


Figura 3. Plantas de biótipos de *Digitaria insularis*, em ensaios de dose-resposta, aos 21 dias após aplicação do glyphosate. Biótipo susceptível de MG (A). Biótipos com início de resistência ao glyphosate BA (B), MT (C) e GO (D).

DISCUSSÃO

O capim-amargoso é uma planta daninha com o maior número de casos de resistência ao glyphosate no Brasil (Gazola, Belapart, Castro, Cipola Filho & Dias, 2016). Nas doses de 720 e 1440 g ha⁻¹ as plantas de capim-amargoso avaliadas aos 7, 14 e 21 DAA não proporcionaram controle aceitável para os biótipos de MT e BA. As avaliações foram conduzidas nestes períodos de tempo, pois o capim-amargoso pode apresentar hábitos de crescimento anual e perene (Brighenti & Oliveira, 2011); e dependendo da dose de glyphosate e das condições ambientais, os sintomas são visíveis dentro de 2 a 4 DAA na maioria das plantas daninhas anuais e após 7 dias em perenes (Franz et al., 1997). Os biótipos de MT e BA sobreviveram em altas doses de glyphosate durante um período prolongado, demonstrando o elevado nível de resistência destes biótipos.

Em oliveiras na Espanha, áreas com histórico de 5 anos de aplicação de glyphosate, populações de *Eleusine indica* e *Paspalum distichum* com suspeita de resistência exibiram níveis de controle na dose de 720 g ha⁻¹ de glyphosate superiores a 68 e 78%, respectivamente, aos 60 DAA. Na dose de 1440 g ha⁻¹, foi de 78% e 83%, respectivamente (Alcántara, Fernandez,

Smeda, Alves & Prado, 2016). Isto sugere que estas doses de glyphosate (as mesmas utilizadas nas avaliações de capim-amargoso) são suficientes para o controle de plantas daninhas quando a resistência ainda não se desenvolveu. Além disso, alguns pesquisadores evidenciaram a alta suscetibilidade do capim-amargoso a este herbicida, documentando valores de GR_{50} inferiores a 100 g ha^{-1} para biótipos suscetíveis (Carvalho et al., 2011; Reinert, Prado & Christoffoleti, 2013). No entanto, alguns agricultores aplicam amplamente doses maiores do que a recomendada a campo, como 1440 g ha^{-1} (Carvalho et al., 2012, Melo, Rosa, Brunharo, Nicolai & Christoffoleti, 2012, Gomes, Santos, Gasparino & Correia, 2017), causando maior pressão de seleção no capim-amargoso e outras plantas daninhas.

O baixo nível de controle dos biótipos MT e BA e as falhas de controle exibidas pelo biótipo GO são preocupantes, uma vez que o capim-amargoso pode se recuperar de danos causados pelo glyphosate. Por exemplo, aplicações de 2880 g ha^{-1} não foram eficazes no controle do capim-amargoso, e apesar da alta taxa de controle inicial, 70% das plantas voltaram a rebrotar, demonstrando grande capacidade de recuperação (Correia & Durigan, 2009).

O glyphosate pode controlar plantas jovens de capim-amargoso, quando originárias de sementes, mas quando as plantas se desenvolvem e formam rizomas, seu controle é ineficaz (Machado et al., 2006). As reservas de amido acumuladas nos rizomas podem ser responsáveis pela tolerância do capim-amargoso ao glyphosate, limitando a translocação e permitindo rápida rebrota da parte aérea após o tratamento com herbicidas (Machado et al., 2008; Carvalho et al., 2012). Portanto, o melhor período para o controle desta espécie seria até 35 dias após a emergência, quando os rizomas ainda não se formaram (Machado et al., 2006).

Quando os biótipos de capim-amargoso desenvolvem a resistência ao glyphosate, os valores do fator de resistência (FR) são elevados. Reinert et al. (2013) relataram valores de $FR > 16$ para o biótipo R de capim-amargoso, com valores de GR_{50} e C_{50} de $108,7$ e $85,5 \text{ g ha}^{-1}$, respectivamente, para o biótipo S. Além disso, este último apresentou redução da matéria seca maior que 90% com 900 g ha^{-1} , enquanto o biótipo R foi de apenas 20% na mesma dose (Reinert et al., 2013). Resultados semelhantes foram observados por

Carvalho et al. (2011), enfatizando a necessidade de doses maiores para reduzir 50% da matéria seca dos biótipos de capim-amargoso R em relação aos biótipos S.

Diferentes níveis de resistência ao glyphosate observados nos biótipos BA e MT sugerem que seus mecanismos de resistência podem diferir entre eles. De acordo com Carvalho et al. (2012), o capim-amargoso pode apresentar mecanismos que contribuem para a resistência ao glyphosate, incluindo a absorção e translocação reduzida do glyphosate, a metabolização em substâncias não tóxicas, ou mutações no sítio de ação no gene da EPSPS.

Espécies de gramíneas como *Echinochloa colona* (Alarcón-Reverte et al., 2015); *E. indica* (Yu et al., 2015) e *Lolium perenne* ssp. *multiflorum* (Salas, Scott, Dayan & Burgos, 2015) apresentaram FR que oscilaram entre 1,4 até 31,1 com base no GR₅₀, e entre 4 e 15 com base no C₅₀, exceto de um biótipo de *E. indica* que o FR foi > 182 (Yu et al., 2015). Estas grandes diferenças da sensibilidade ao glyphosate se deve aos diferentes mecanismos de resistência que cada biótipo apresenta. No caso da *E. colona*, a resistência ao glyphosate foi devido as mutações na posição Pro-106 do sítio de ação e da atividade basal melhorada da EPSPS (Alarcón-Reverte et al., 2015). O genótipo mais resistente de *E. indica* desenvolveu uma dupla mutação, conhecida como TIPS nas posições Thr-102-Ile e Pro-106-Ser (Yu et al., 2015); e em *L. perenne* ssp. *multiflorum*, a resistência foi devida ao número de cópias múltiplas e a superexpressão do gene da EPSPS (Salas et al., 2015).

CONCLUSÃO

A resistência ao glyphosate foi confirmada nos biótipos de MT e BA de capim-amargoso coletados em campos cultivados com culturas RR, apresentando alto nível de resistência a esse herbicida. Embora o biótipo GO tenha sido caracterizado como suscetível, possui alto potencial para desenvolver a resistência, pois apresenta falhas de controle em doses superiores a 720 g ha⁻¹.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

REFERÊNCIAS

Alarcón-Reverete, R., García, A., Watson, S. B., Abdallah, I., Sabaté, S., Hernández, M. J., ... Fischer, A. J. (2015). Concerted action of target-site mutations and high EPSPS activity in glyphosate-resistant junglerice (*Echinochloa colona*) from California. *Pest Management Science*, 71, 996-1007. doi: 10.1002/ps.3878

Alcántara, R., Fernandez, P., Smeda, R. J., Alves, P. L., & Prado, R. (2016). Response of *Eleusine indica* and *Paspalum distichum* to glyphosate following repeated use in citrus groves. *Crop Protection*, 79, 1-7. doi: 10.1016/j.cropro.2015.09.027

Alcántara-de la Cruz, R., Fernández-Moreno, P. T., Ozuna, C. V., Rojano-Delgado, A. M., Cruz-Hipólito, H. E., Domínguez-Valenzuela, J. A., ... De Prado, R. (2016). Target and non-target site mechanisms developed by glyphosate-resistant hairy beggarticks (*Bidens pilosa* L.) populations from Mexico. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1492. doi: 10.3389/fpls.2016.01492

Brighenti, A. M., & Oliveira, M. (2011). F. Biología de plantas daninhas. In: Oliveira Jr, R. S.; Constantín, & J.; Inoue, M. H. (Eds.). *Biología e manejo de plantas daninhas* (p. 9). Curitiba: Omnipax.

Carvalho, L. B., Alves, P., González-Torralva, F., Cruz-Hipólito, H. E., Rojano-Delgado, A. M.; De Prado, R.; ... Luque de Castro, M. D. (2012). Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 60, 615-622. doi: 10.1021/jf204089d

Carvalho, L. B., Cruz-Hipólito, H., González-Torralva, F., Alves, P. L. C. A., Christoffoleti, P. J., & Prado, R. (2011). Detection of sourgrass (*Digitaria insularis*) biotypes resistant to glyphosate in Brazil. *Weed Science*, 59, 171-176. doi: 10.1614/WS-D-10-00113.1

Cerdeira, A. L., Gazziero, D. L. P., Duke, S. O., & Matallo, M. B. (2011). Agricultural impacts of glyphosate-resistant soybean cultivation in

South America. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 5799-5807. doi: 10.1021/jf102652y

Cruz-Hipolito, H. E., Rojano-Delgado, A., Domínguez-Valenzuela, J. A., Heredia, A., Luque De Castro, M. D., & De Prado, R., (2011). Glyphosate tolerance by *Clitoria ternatea* and *Neonotonia wightii* plants involves differential absorption and translocation of the herbicide. *Plant Soil*. 347, 221-230. doi: 10.1007/s11104-011-0840-9

Correia, N. M., & Durigan, J. C. (2009). Manejo químico de plantas adultas de *Digitaria insularis* com glyphosate isolado e em mistura com chlorimuron-ethyl ou quizalofop-p-tefuril em área de plantio direto. *Bragantia*, 68 (3), 689-697. doi: 10.1590/S0006-87052009000300016

Duke, S. O., Baerson, S. R., & Rimando, A. M. (2003). Glyphosate. In: Plimmer, J. R., Gammon, D. W., Ransdale, N. N. (Eds.), *Encyclopedia of Agrochemicals*. John Wiley & Sons, doi: 10.1002/047126363X.agr119

Duke, S. O., & Powles, S. B. (2008). Glyphosate: A once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64 (4), 319-25. doi: 10.1002/ps.1518

Franz, J. E., Mao, M. K., & Sikorski, J. A. (1997). Glyphosate: A unique global herbicide. ACS Monograph 189. American Chemical Society, ISBN 978-0841234581, Washington, DC, USA.

Gazola, T., Belapart, D., Castro, E. B., Cipola Filho, M. L., & Dias, M. F. (2016). Características biológicas de *Digitaria insularis* que conferem sua resistência à herbicidas e opções de manejo. *Científica*, 44 (4), 557-567. doi: 10.15361/1984-5529.2016v44n4p557-567

Gomes, L. J. P., Santos, J. I., Gasparino, E. C., & Correia, N. M. (2017) Chemical control and morphoanatomical analysis of leaves of different populations of sourgrass. *Planta Daninha*, 35, e017158021. doi: 10.1590/S0100-83582017350100008

Heap, I. *The international survey of herbicide resistant weeds*. Disponível em: <<http://www.weedscience.org>>. Acesso em: 04 de abril de 2017.

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. (2008). Caracterização anatômica de folha, colmo e rizoma de *Digitaria insularis*. *Planta Daninha*, 26 (1), 1-8. doi: 10.1590/S0100-83582008000100001

Machado, A. F. L., Ferreira, L. R., Ferreira, F. A., Fialho, C. M. T., Tuffi Santos, L. D., & Machado, M. S. (2006). Análise do crescimento de *Digitaria insularis*. *Planta Daninha*, 24 (4), 641-647. doi: 10.1590/S0100-83582006000400004

Melo, M. S. C., Rosa, L. E., Brunharo, C. A. C. G., Nicolai, M., & Christoffoleti, P. J. (2012). Alternativas para o controle químico de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao glyphosate. *Revista Brasileira de Herbicidas*, 11 (2), 195-203. doi: 10.7824/rbh.v11i2.145

Orcaray, L., Zulet, A., Zabalza, A., & Royuela, M. (2012). Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide glyphosate. *Journal of Plant Physiology*, 169 (1), 27-33. doi: 10.1016/j.jplph.2011.08.009

Powles, S. B., & Yu, Q. (2010). Evolution in action: plant resistance to herbicides. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 317-347. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112119

Powles, S. B. (2008). Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: Lessons to be learnt. *Pest Management Science*, 64 (4), 360-365. doi: 10.1002/ps.1525

Reinert, C. S., Prado, A. B. C. A., & Christoffoleti, P. J. (2013). Curva de dose-resposta comparativas entre os biótipos resistente e suscetível de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) ao herbicida glyphosate. *Revista Brasileira de Herbicidas*, 12 (3), 260-267. doi: 10.7824/rbh.v12i3.223

Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., & Gerhard, D. (2015). Dose-response analysis using R. *PLoS ONE*, 10 (12), e0146021. doi: 10.1371/journal.pone.0146021

Salas, R. A., Scott, R. C., Dayan, F. E., & Burgos, N. R. (2015). EPSPS Gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) populations from Arkansas (United States). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 63 (25), 5885-5893. doi: 10.1021/acs.jafc.5b00018

Székács, A., & Darvas, B. (2012). Forty years with glyphosate. In: Hasaneen, M. N., ed., *Herbicides-properties, synthesis and control of weeds*. InTech, (p. 247-284). doi: 10.5772/32491.

Vencill, W. K., Nichols, R. L., Webster, T. M., Soteris, J. K., Mallory-Smith, C., Burgos, N. R., Johnson, W. G & McClelland, M. R. (2012).

Herbicide Resistance: Toward an Understanding of Resistance Development and the Impact of Herbicide-Resistant Crops. *Weed Science*, Special 60, 2-30. doi: 10.1614/WS-D-11-00206.1

Yanniccari, M., Vila-Aiub, M., Istilart, C., Acciaresi, H., & Castro, A. M. (2016). Glyphosate resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) is associated with a fitness penalty. *Weed Science*, 64 (1), 71-79. doi: 10.1614/WS-D-15-00065.1

Yu, Q., Jalaludin, A., Han, H., Chen, M., Sammons, R. D., & Powles, S. B. (2015). Evolution of a double amino acid substitution in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Eleusine indica* conferring high-level glyphosate resistance. *Plant Physiology*, 167 (4), 1440-1447. doi: 10.1104/pp.15.0014

É POSSÍVEL IDENTIFICAR A RESISTÊNCIA DO CAPIM-AMARGOSO AO GLYPHOSATE NO CAMPO?

RESUMO: Capim-amargoso (*Digitaria insularis* (L.) Mez ex Ekman/Fedde) é a planta daninha resistente ao glyphosate de maior ocorrência no Brasil. No entanto, identificar rapidamente sua resistência a campo ainda é difícil. Neste trabalho foram caracterizados os padrões fisiológicos em plantas de capim-amargoso tratadas com glyphosate visando discriminar a resistência desta espécie a este herbicida no campo. As características fisiológicas (taxa fotossintética, consumo de CO₂, carbono interno, razão Ci/Ca, condutância estomática, taxa de transpiração e eficiência do uso da água) foram medidas em dois biótipos resistentes (R) e um suscetível (S) de capim-amargoso tratados com glyphosate (0, 360, 720, 1440 e 2880 g ha⁻¹). Para isso, foi utilizado um analisador de gás infravermelho (IRGA) e as avaliações foram realizadas aos 7 dias após a aplicação do herbicida. As maiores alterações causadas pelo glyphosate nas plantas de capim-amargoso foram observadas nas doses de 360 e 720 g ha⁻¹. A taxa fotossintética, o consumo de CO₂, a taxa de transpiração e a eficiência do uso da água foram menores nas plantas S do que nas R, à medida que as doses de glyphosate aumentaram. A concentração de CO₂ na câmara subestomática, a razão Ci/Ca e a condutância estomática foram maiores nas plantas S comparadas com as plantas R. No entanto, as características fisiológicas foram afetadas de forma semelhante nas doses de 1440 (dose de campo) e 2880 g ha⁻¹, e/ou quando houve diferenças, não foi possível estabelecer padrões fisiológicos, devido à grande variabilidade dos indivíduos dentro de um biótipo. Concluiu-se que a medição das características fisiológicas pelo IRGA não deve ser recomendada para discriminar a resistência ao glyphosate do capim-amargoso a campo.

PALAVRAS-CHAVE: características fisiológicas; *Digitaria insularis*; IRGA; resistência a herbicidas.

IS IT POSSIBLE TO IDENTIFY GLYPHOSATE RESISTANCE OF SOURGRASS IN THE FIELD?

ABSTRACT: Sourgrass (*Digitaria insularis* (L.) Mez ex Ekman/Fedde), is the commonest glyphosate-resistant weed in Brazil. However, identifying its resistance in the field during chemical weed control is still difficult. In this work, the physiological patterns were characterized in sourgrass plants treated with glyphosate aiming to discriminate the glyphosate resistance of this species in the field. Physiological patterns (photosynthetic rate, CO₂ consumption, stomatal conductance, transpiration rate and water use efficiency), were measured in resistant (R) and susceptible (S) sourgrass plants treated with glyphosate (0, 360, 720, 1440 and 2880 g ae ha⁻¹). The evaluations were carried out at 7 days after the application of the herbicide using an infrared gas analyzer (IRGA). The greatest alterations caused by glyphosate in the sourgrass plants were observed at 360 and 720 g ae ha⁻¹. Photosynthetic rate, CO₂ consumption, transpiration rate and water use efficiency were lower in S sourgrass plants than in the R ones, as the glyphosate doses increased. The CO₂ concentration in the substomatic chamber, the ratio of internal to atmospheric CO₂ concentration and stomatal conductance were higher in S plants compared to R ones. However, the physiological parameters were affected similarly at 1440 (field dose) and 2880 g ae ha⁻¹, and/or when there were differences, these was not possible to establish the physiological patterns, due to the great variability within individuals of a biotype. It was concluded that the measurement of the physiological parameters by IRGA cannot be used to discriminate the glyphosate resistance of sourgrass in the field.

KEYWORDS: *Digitaria insularis*; herbicide resistance; IRGA; physiological characteristics.

INTRODUÇÃO

O glyphosate [(N-fosfonometil) glicina] é um herbicida não seletivo e sistêmico utilizado globalmente há mais de 40 anos para o controle de plantas daninhas (Székács e Darvas, 2012). Este herbicida atua rapidamente na redução da atividade fotossintética por meio de seus efeitos complexos na rota metabólica do shiquimato, processo fotossintético e eventos oxidativos das plantas (Gomes et al., 2017), causando desregulação do fluxo de carbono, nutrição mineral e outras vias essenciais (Orcaray et al., 2012; Gomes et al., 2014).

O capim-amargoso (*Digitaria insularis* (L.) Mez ex Ekman/Fedde) é uma planta daninha com mecanismo fotossintético C₄ (Machado et al., 2006), cujo aproveitamento da luz solar e resposta fotossintética são maiores em condições ambientais de alta irradiância e temperatura elevada (Sage, 2004). O aumento de áreas cultivadas com culturas resistentes ao glyphosate (culturas RR) também levou ao aumento de biótipos resistentes desta espécie no Brasil (Gazola et al., 2016).

O controle químico das plantas daninhas é essencial, porém falhas de controle podem ocorrer particularmente observando se a causa foi decorrente da seleção de resistência ao herbicida na população (R4P Network, 2016). Assim, o emprego de técnicas que identifiquem e caracterizem a resistência aos herbicidas torna-se vital em tais situações (Burgos et al., 2013). Vários métodos bioquímicos, enzimáticos e moleculares foram desenvolvidos para diagnosticar a resistência aos herbicidas (Burgos, 2015; Dayan et al., 2015; Déyle et al., 2015). No entanto, a sua aplicação é restrita por algumas condições, estando em grande parte confinada a centros de pesquisa, de tal forma que discriminar a resistência no campo durante o controle químico das plantas daninhas, ainda é difícil (Zhang et al. 2016). Além disso, os resultados da confirmação da resistência aos herbicidas na maioria dos casos podem levar várias safras de cultivo (Burgos et al., 2013).

Os primeiros efeitos do glyphosate estão relacionados com à fotossíntese (Gomes et al., 2017; Zobiole et al., 2010). Dependendo da dose de glyphosate e as condições ambientais, as plantas anuais apresentam

sintomas entre 2 e 4 dias após a aplicação (DAA), e plantas perenes após 7 DAA (Franz et al., 1997). A taxa fotossintética e condutância estomática, mensuradas com um analisador de gás infravermelho (IRGA), apresentaram diferenças entre plantas de *Lolium perenne* resistentes e susceptíveis ao glyphosate, durante os primeiros 7 DAA do herbicida (Yannicari et al., 2012). Estes pesquisadores concluíram que a condutância estomática é um potencial parâmetro para avaliar a susceptibilidade diferencial ao glyphosate. No entanto, avaliar estes parâmetros a campo é inviável neste curto período, porque os sintomas causados pelo glyphosate não são evidentes além de que as densidades de população de plantas daninhas são maiores que a cultura (Andrew et al., 2015). A caracterização destas variáveis fisiológicas e outras, após este período e uma vez que as plantas apresentam sintomas, poderiam ajudar a discriminar a resistência a campo.

O objetivo foi avaliar as características fisiológicas (transpiração, consumo de CO₂, eficiência de uso da água, abertura estomática, entre outros) do capim-amargoso aos 7 DAA usando o IRGA, visando identificar padrões destas variáveis fisiológicas para a discriminação da resistência ao glyphosate.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem dos biótipos de capim-amargoso

Foram utilizadas sementes de três biótipos previamente caracterizados com diferentes níveis de susceptibilidade ao glyphosate. Sendo, dois biótipos resistentes ao glyphosate (R) coletados em lavouras de soja RR e milho, nas regiões de Correntina - Bahia (BA) (13°20'36"S, 44°38'12"W) e Confresa - Mato Grosso (MT) (13°20'36"S, 44°38'12"W). Um biótipo susceptível (S), coletado em uma área não tratada com glyphosate em Viçosa - Minas Gerais (MG) (20°45'14"S, 42°52'55"W). Sementes de cada biótipo foram semeadas em bandejas de poliestireno preenchidas com substrato (Tropstrato HT – Vida Verde Indústria). Após a germinação, as mudas foram transferidas para vasos individuais contendo 300 cm³ de substrato e areia (1:1).

Aplicações de glyphosate

As plantas de cada biótipo de capim-amargoso foram tratadas no estágio de 3 a 4 folhas com as seguintes doses de glyphosate (Roundup Original, 360 g de equivalente ácido (ea) L⁻¹, Monsanto, Brasil): 0, 360, 720, 1440 (dose recomendada de campo) e 2880 g ha⁻¹. As aplicações do herbicida foram feitas utilizando um pulverizador costal pressurizado a CO₂ equipado com uma ponta de pulverização do tipo leque 110015, calibrado para aplicar 150 L ha⁻¹ de calda.

Mensuração das características fisiológicas

As características fisiológicas dos biótipos de capim-amargoso foram determinadas aos 7 DAA do glyphosate, utilizando um analisador de gases no infravermelho (IRGA) marca ADC, modelo LCA PRO+ (Analytical Development Co. Ltd, Hoddesdon, UK), em ambiente protegido. As avaliações foram realizadas na penúltima folha completamente expandida das plantas de capim-amargoso entre as 7 e 10 horas da manhã. As variáveis analisadas foram a taxa fotossintética (**A** - μmol m⁻² s⁻¹), a concentração de CO₂ na câmara subestomática (**C_i** - μmol mol⁻¹), sendo calculado o CO₂ consumido pela planta (**ΔC** - μmol mol⁻¹) e a razão entre a concentração interna e no ambiente de CO₂ (**C_i/C_a** - μmol CO₂), a condutância estomática (**g_s** - mol m⁻¹ s⁻¹), a taxa de transpiração (**E** - mol H₂O m⁻² s⁻¹) e a eficiência do uso da água (**EUA** - mol CO₂ mol H₂O⁻¹) obtida pela relação entre **A** e **E**. O experimento foi organizado de forma completamente aleatória com seis repetições por dose e foi repetido novamente.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando necessário, as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey a 5% de probabilidade para diferenciar os efeitos das doses nos biótipos de capim-amargoso. Para o fator quantitativo, foi utilizada regressão linear. O modelo selecionado foi baseado na explicação biológica do fenômeno e na significância dos coeficientes (p <0,05). As análises estatísticas foram conduzidas usando o programa Statistix 9.0 (Analytical Software, EUA).

RESULTADOS

O GR_{50} (dose necessária para reduzir 50% da matéria seca) para o biótipo S de MG foi previamente estimado em $243,7 \text{ g ha}^{-1}$. Com base nesse valor, os biótipos de MT e BA foram de 3,1 e 6,1 vezes mais resistentes, respectivamente (Resultados referentes ao trabalho anterior).

Os biótipos de capim-amargoso R e S apresentaram semelhança na **A** e nos níveis de CO_2 no controle aos 7 DAA, demonstrando que não há influência de outros fatores. No entanto, essas características mostraram diferenças entre os biótipos e sintomas de clorose que foram observados à medida que as doses de glyphosate aumentaram (**Figura 1**).

Observou-se redução gradual da **A** nos biótipos de capim-amargoso. Nas doses de 360 e 720 g ha^{-1} de glyphosate, o biótipo MG apresentou menores valores de **A** em comparação aos R (BA e MT). Na dose de 1440 (recomendada de campo) e 2880 g ha^{-1} não houve diferença nesta variável entre os biótipos de capim-amargoso (**Figura 1A**).

Houve aumento da **Ci** no biótipo de MG em relação aos biótipos resistentes de MT e BA. Esta variável não foi afetada significativamente nos biótipos R nas diferentes doses de glyphosate dentro do mesmo biótipo (**Figura 1B**).

Observou uma redução gradual do **ΔC** pela fotossíntese nos biótipos de capim-amargoso. As maiores diferenças entre os biótipos S e R foram observados entre 360 e 1440 g ha^{-1} , onde o biótipo S (MG) apresentou a maior redução do **ΔC**. Esta variável também foi menor para os biótipos R em comparação ao seu respectivo controle, mas sem diferenças entre eles. Na dose mais elevada, os valores de **ΔC** foram semelhantes para os três biótipos (**Figura 1C**).

O biótipo S apresentou maior razão **Ci/Ca** quando comparada aos biótipos R. O biótipo S apresentou altos incrementos desta variável quando comparado ao controle a partir da dose de 720 g ha^{-1} (**Figura 1D**).

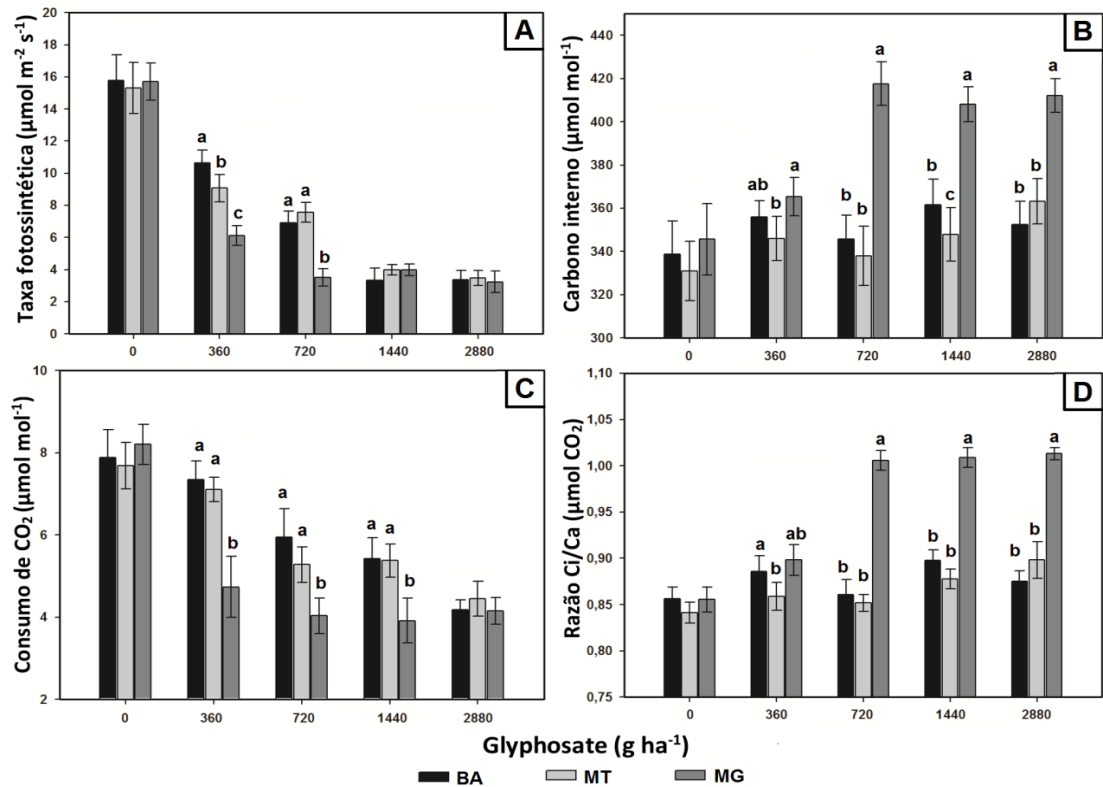


Figura 1. Taxa fotossintética (A), Concentração de CO₂ na câmara subestomática (B), Consumo de CO₂ (C) e a Razão interna e atmosférica de CO₂ (D), medida pelo IRGA na penúltima folha totalmente expandida dos biótipos de *Digitaria insularis* aos 7 dias após aplicação de glyphosate. Cada grupo de barras corresponde a uma dose. Diferentes letras diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

As respostas fisiológicas (**gs**, **E** e **EUA**) dos biótipos de capim-amargoso foram semelhantes no controle (**Figura 2**).

Os valores de **gs** e **E** diminuíram para os biótipos S e R com grande variabilidade à medida que as doses de glyphosate aumentaram. Nas doses de 720 e 1440 g ha⁻¹, os valores de **gs** e **E** foram maiores para o biótipo R em comparação com o biótipo S. Embora o biótipo da BA tenha sido previamente caracterizado como o mais resistente ao glyphosate, este não apresentou diferenças para **gs** em relação ao biótipo S a 2880 g ha⁻¹ (**Figura 2A**). Nesta mesma dose, não houve diferenças para à **E** entre os biótipos (**Figura 2B**).

O biótipo de MG (S) apresentou maior redução da **EUA** a 360 e 720 g ha⁻¹ em relação aos biótipos R, enquanto que nas doses de 1440 e 2880 g ha⁻¹, ambos os biótipos R e S não apresentaram diferenças (**Figura 2C**).

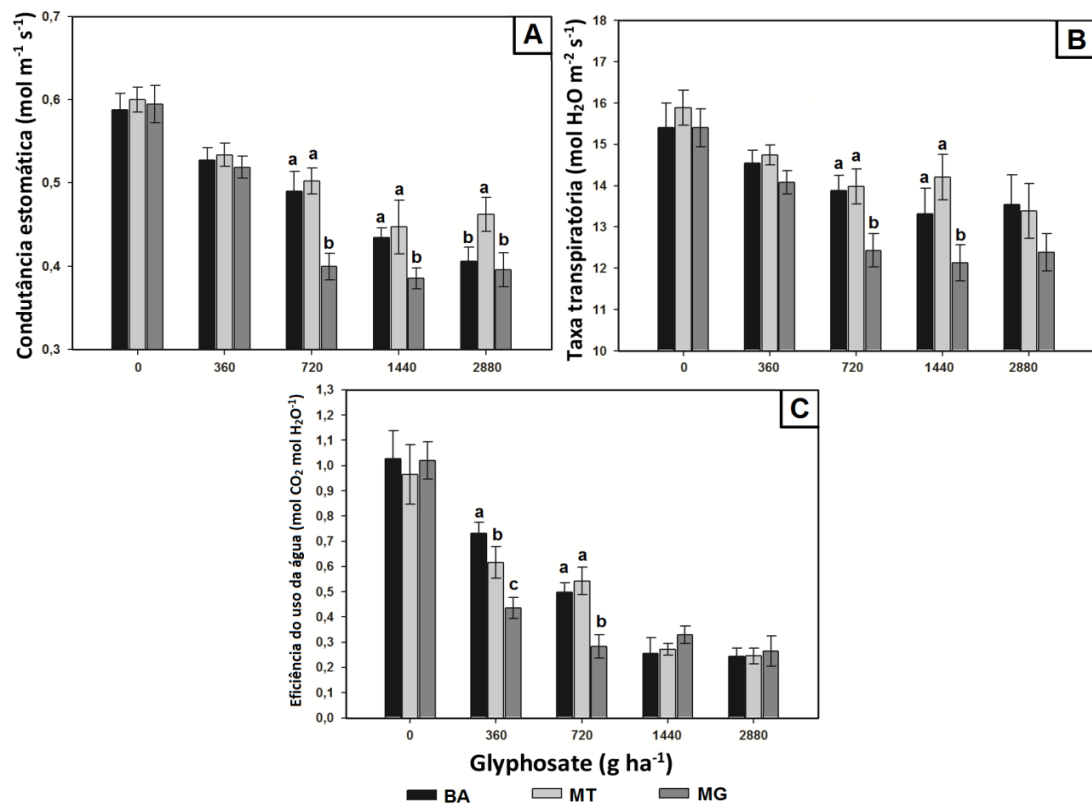


Figura 2. Condutância estomática (A) Taxa transpiratória (B) e Eficiência do Uso da Água (C) medida pelo IRGA na penúltima folha totalmente expandida dos biótipos de *Digitaria insularis* aos 7 dias após aplicação de glyphosate. Cada grupo de barras corresponde a uma dose. Diferentes letras diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A análise de regressão não permitiu estabelecer um padrão confiável para discriminar a resistência. Em alguns casos, o ajuste só foi possível com quatro pontos (0, 360, 720 e 1440 g ha⁻¹) para atingir um nível de confiabilidade (R²) maior que 50% (**Tabela 1**).

Tabela 1. Equação de regressão linear e coeficiente (R^2) das características fisiológicas dos biótipos de *Digitaria insularis* medidos pelo IRGA aos 7 dias após aplicação do glyphosate.

Características	Biótipo	Equação	R^2
Taxa fotossintética (A)	MG [†]	Y = -0,0071x + 11,78	0,58
	BA	Y = -0,0038x + 12,17	0,68
	MT	Y = -0,0035x + 11,65	0,69
Carbono interno (Ci)	MG	Y = 0,0197x + 369,55	0,48
	BA [†]	Y = 0,0199x + 340,46	0,73
	MT	Y = 0,0118x + 330,42	0,77
Consumo de CO ₂ (ΔC)	MG [†]	Y = -0,0026x + 6,84	0,61
	BA	Y = -0,0009x + 7,33	0,74
	MT	Y = -0,0007x + 6,92	0,48
Razão CO ₂ interno e atmosférico (Ci/Ca)	MG	Y = 5E-05x + 0,90	0,57
	BA [†]	Y = 2E-05x + 0,86	0,50
	MT	Y = 2E-05x + 0,84	0,93
Condutância estomática (gs)	MG	Y = -6E-05x + 0,52	0,53
	BA	Y = -6E-05x + 0,55	0,84
	MT	Y = -4E-05x + 0,56	0,63
Taxa transpiratória (E)	MG	Y = -0,0009x + 14,24	0,51
	BA	Y = -0,0005x + 14,74	0,55
	MT	Y = -0,0007x + 15,18	0,68
Eficiência do uso da água (EUA)	MG [†]	Y = -0,0004x + 0,78	0,55
	BA	Y = -0,0002x + 0,82	0,71
	MT	Y = -0,0002x + 0,77	0,72

[†]O ajuste > 50% foi realizado com quatro pontos correspondente as seguintes doses de glyphosate: 0, 360, 720 e 1440 g ha⁻¹.

DISCUSSÃO

O capim-amargoso é a espécie com resistência ao glyphosate mais importante no Brasil (Gazola et al., 2016). Contudo, a identificação rápida de sua resistência no campo ainda é difícil (Zhang et al., 2016). As alterações fisiológicas causadas pelo glyphosate nos biótipos de capim-amargoso R e S foram mensuradas com um IRGA aos 7 DAA, tempo prudente para

monitorar o controle de plantas daninhas, e poder visualizar sintomas em plantas tratadas (Franz et al., 1997).

As principais diferenças em termos de características fisiológicas de capim-amargoso foram a doses de glyphosate de 360 e 720 g ha⁻¹. Este herbicida reduziu **A** em plantas de capim-amargoso R e S, resultado da inibição da EPSPS e da biossíntese de aminoácidos aromáticos (Alcántara-de la Cruz et al., 2016). A redução da **A** foi em diferentes níveis entre as plantas R e S, sendo significativamente maior no último biótipo. Isto indica que o glyphosate atingiu o local alvo, mas nestas doses (360 e 720 g ha⁻¹) não foram suficientes para reduzir completamente a **A** das plantas R demonstrando a sua resistência ao glyphosate.

Plantas de capim-amargoso R apresentaram folhas com mais nervuras em relação as S (Barroso, 2015). Estas folhas têm menor resistência hidráulica e taxas fotossintéticas mais elevadas (Devine et al., 1992). Além disso, o glyphosate para agir deve ser translocado das folhas para os tecidos meristemático (Alcántara-de la Cruz et al., 2016), mas a translocação do ¹⁴C-glyphosate foi consideravelmente menor em plantas de capim-amargoso R (Carvalho et al., 2012). Isso poderia explicar porque a **A** foi menos afetada nestes biótipos R.

A maior **Ci** em plantas de capim-amargoso S, em comparação com as R, pode ser devida à maior acumulação de ácido shiquímico causada pelo glyphosate, ocasionando um forte dreno de carbono no ciclo de Calvin e diminuindo a **A** (Shieh et al., 1991). **Ci** é influenciado por fatores ambientais, bem como, variações em **gs**, que podem limitar a absorção de CO₂ nas folhas ou na **A** usando o CO₂ da câmara substomática (Sage, 2004). As plantas C₄, como o capim-amargoso, apresentam fotorrespiração sob baixos níveis de **Ci** causadas pelo estresse abiótico, fechando os estômatos (Ehleringer et al., 1991). Nestas condições, a fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP) atua mais eficientemente do que a rubisco, como carboxilase, mantendo o potencial fotossintético das plantas C₄ (Fernando et al., 2016). Isto sugere que as plantas R de capim-amargoso possivelmente fecham os estômatos mais rapidamente do que as plantas S para sobreviver, em resposta ao estresse abiótico causado pelo glyphosate, causando maior resistência ao influxo de CO₂ pela **gs** (Kaminski et al., 2015). Portanto, as

plantas R foram capazes de completar vias metabólicas mais essenciais em níveis inferiores de **C_i** do que o biótipo S. Assim, o menor **C_i** encontrado em plantas R pode ser devido à maior **A** com uma maior taxa de carboxilação incorporando o CO₂ a compostos orgânicos.

O alto **C_i** em plantas S podem explicar o baixo **ΔC**. Isto é consequência do metabolismo mais lento, causando efeitos indiretos na fotossíntese pelo glyphosate e consequentemente à redução do crescimento (Evans, 2013). Em geral, quanto mais acelerado for o metabolismo da planta, maior é o **ΔC** por unidade de tempo (Galon et al., 2010). Plantas de *Lolium multiflorum* R e S mostraram que **ΔC** diminuiu sob condições de competição, quando plantas isoladas competiram com duas ou mais plantas do biótipo oposto. Entretanto, quando plantas do mesmo biótipo competiam entre si, a redução de **ΔC** no biótipo R foi baixa, em alta densidade de plantas (Concenço et al., 2007). Isto sugere que as plantas de capim-amargoso R captam o CO₂ mais eficientemente da atmosfera do que as plantas S após a aplicação do glyphosate. O que justificando a maior razão **C_i/C_a** (relação entre as concentrações **C_i** e **ΔC**) nas trocas gasosas de plantas S, pois a menor razão **C_i/C_a** no biótipo R poderia ter sido o resultado do aumento na capacidade fotossintética, então, a **A** por unidade de área foliar será maior envolvendo a **g_s** (Condon et al., 2004). Isto porque a reduzida razão **C_i/C_a** é resultado de uma baixa **g_s** (Farquhar et al., 1989).

A diminuição da **g_s** pode reduzir a absorção de glyphosate pelas plantas, o que reduz a eficácia deste herbicida (Fernando et al., 2016). As plantas de capim-amargoso apresentaram reduzida **g_s**, sendo maior em plantas S do que em R. Para a manutenção da fotossíntese com redução da abertura estomática, é necessária maior eficiência no consumo de CO₂ no mesofilo foliar, o que reduz a razão **C_i/C_a** (Flexas et al., 2008). Portanto, isso sugere que as plantas S não poderiam fixar o CO₂ de forma eficiente. Além disso, as células guarda controlam o fechamento estomático e indiretamente a transpiração, indicando sensibilidade à ação do glyphosate (Shanner, 1978). Isto explica porque as plantas de capim-amargoso S apresentaram baixo **E**. Plantas de soja R e S apresentaram **g_s** e **E** reduzidos em comparação com as plantas não tratadas (Ding et al., 2011). Zobiole et al.

(2010), relataram redução de **gs** devido ao aumento da dose de glyphosate em soja R, com uma acentuada diminuição da **E** e **A**.

A **EUA** está diretamente relacionada à abertura estomática, pois enquanto a planta absorve CO₂ para a fotossíntese, também perde água por transpiração (Concenço et al., 2007). O biótipo de capim-amargoso S apresentou menor **EUA**. No entanto, essa redução deve-se a menor **A** causada pela intoxicação do herbicida (Silveira et al., 2013). Isso ocorre porque, quando a **E** está ativa, há fluxo contínuo de água das raízes para a parte aérea, um processo essencial para transportar o herbicida absorvido (Medrano et al., 2015), dado que o glyphosate é rapidamente absorvido e translocado durante as primeiras 96h após o tratamento (Alcántara-de la Cruz et al., 2016). Os efeitos negativos de alguns herbicidas sobre **A** causado pelo metabolismo mais lento da planta influenciam na **EUA** (Galon et al., 2010). Portanto, estes processos metabólicos (**A**, **E** e **EUA**) em plantas de capim-amargoso S retardam em um grau maior do que em plantas R aos 7 DAA.

CONCLUSÃO

Embora as diferenças nas alterações fisiológicas causadas pelo glyphosate entre os biótipos de capim-amargoso R e S foram evidentes, na dose de campo (1440 g ha⁻¹) ou superior, essas variáveis foram afetadas de forma similar, e/ou quando houve diferenças nestas doses, não foi possível diferenciar estes padrões fisiológicos entre os biótipos, devido à grande variabilidade dentro dos indivíduos de um biótipo. Portanto, a mensuração das características fisiológicas pelo IRGA não permite discriminar a resistência ao glyphosate do capim-amargoso no campo.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

REFERÊNCIAS

- Alcántara-de la Cruz, R.; Barro, F.; Domínguez-Valenzuela, J.A.; De Prado, R. 2016. Physiological, morphological and biochemical studies of glyphosate tolerance in Mexican Cologania (*Cologania broussonetii* (Balb.) DC.). *Plant Physiology Biochemistry* 98: 72–80.
- Andrew, I.K.S.; Storkey, J.; Sparkes, D.L. 2015. A review of the potencial for competitive cereal cultivars as a tool in integrated weed management. *Weed Research* 55: 239-248.
- Barroso, A.A.M.; Galeano, E.; Albrecht, A.J.P.; Reis, F.F.; Victoria-Filho, R. 2015. Does sourgrass leaf anatomy influence glyphosate resistance? *Comunicata Scientiae* 6: 445–453.
- Burgos, N.R.; Tranel, P.T.; Streibig, J.C.; Davis, V.M.; Shaner, D.; Norsworthy, J.K.; Ritz, C. 2013. Confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. *Weed Science* 61: 4–20.
- Burgos, N.R. 2015. Whole-plant and seed bioassays for resistance confirmation. *Weed Science* 63(sp1): 152–165.
- Carvalho, L.B.; Alves, P.L.C.A.; González-Torralva, F.; Cruz-Hipólito, H.E.; Rojano-Delgado, A.M.; De Prado, R.; Gil-Hummanes, J.; Barro, F.; Luque de Castro, M.D. 2012. Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 615–622.
- Concenço, G.; Ferreira, E.A.; Silva, A.A.; Ferreira, F.A.; Viana, R.G.; D'Antonino, L.; Vargas, L.; Fialho, C.M.T. 2007. Water use in italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotypes under competition. *Planta Daninha* 25: 449–455.
- Condon, A.G.; Richards, R.A.; Rebetzke, G.J.; Farquhar, G.D. 2004. Breeding for high water-use efficiency. *Journal of Experimental Botany* 55: 2447–2460.
- Dayan, F.E.; Owens, D.K.; Corniani, N.; Silva, F.M.L.; Watson, S.B.; Howell, J.L.; Shaner, D.L. 2015. Biochemical markers and enzyme assays for herbicide mode of action and resistance studies. *Weed Science* 63(sp1): 23–63.

- Devine, M.D.; Duke, S.O.; Fedtke, C. 1992. Foliar absorption of herbicides. In: Devine, M.D.; Duke, S.O.; Fedtke, C. editors, Physiology of herbicide action. Prentice Hall, New Jersey. p. 29–52.
- Délye, C.; Duhoux, A.; Pernin, F.; Riggins, C.W.; Tranel, P.J. 2015. Molecular mechanisms of herbicide resistance. *Weed Science* 63(sp1): 91–115.
- Ding, W.; Reddy, K.N.; Zablotowicz, R.M.; Bellaloui, N.; Arnold-Bruns, H. 2011. Physiological responses of glyphosate-resistant and glyphosate sensitive soybean to aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate. *Chemosphere* 83: 593–598.
- Evans, J.R. 2013. Improving Photosynthesis. *Plant Physiology* 162: 1780–1793.
- Ehleringer, J.R.; Sage, R.F.; Flanagan, L.B.; Pearcy, R.W. 1991. Climate change and the evolution of C₄ photosynthesis. *Trends in Ecology & Evolution* 6: 95–99.
- Farquhar, G.D.; Ehleringer, J.R.; Hubick, K.T. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 503–537.
- Fernando, N.; Manalil, S.; Florentine, S.K.; Chauhan, B.S.; Seneweera, S. 2016. Glyphosate resistance of C₃ and C₄ weeds under rising atmospheric CO₂. *Frontiers Plant Science* 7: 910. doi: 10.3389/fpls.2016.00910
- Flexas, J.; Ribas-Carbó, M.; Diaz-Espejo, A.; Galmes, J.; Medrano, H. 2008. Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. *Plant, Cell and Environment* 31: 602–621.
- Franz, J.E.; Mao, M.K.; Sikorski, J.A. 1997. Glyphosate: An unique global herbicide. ACS Monographs, Washington.
- Galon, L.; Concenço, G.; Ferreira, E.A.; Aspiazú, I.; Silva, A.F.; Ferreira, F.A.; Silva, A.A.; Tironi, S.P.; Freitas, M.A.M.; Soares, E.R. 2010. Water use efficiency in sugarcane genotypes submitted to herbicide application. *Planta Daninha* 28: 777–784.
- Gazola, T.; Belapart, D.; Castro, E.B.; Cipola-Filho, M.L.; Dias, M.F. 2016. *Digitaria insularis* biological features that give their resistance to herbicides and options management. *Científica* 44: 557–567.

- Gomes, M.P.; Le Manac'h, S.G.; Hénault-Ethier, L.; Labrecque, M.; Lucotte, M.; Juneau, P. 2017. Glyphosate-dependent inhibition of photosynthesis in willow. *Frontiers Plant Science* 8: 207. doi: 10.3389/fpls.2017.00207
- Gomes, M.P.; Smedbol, E.; Chalifour, A.; Hénault-Ethier, L.; Labrecque, M.; Lepage, L.; Lucotte, M.; Juneau, P. 2014. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: An overview. *Journal of Experimental Botany* 65: 4691–4703.
- Kaminski, K.P.; Kørup, K.; Kristensen, K.; Nielsen, K.L.; Liu, F.; Topbjerg, H.B.; Kirk H.G.; Andersen, M.N. 2015. Contrasting water-use efficiency (WUE) responses of a potato mapping population and capability of modified ball-berry model to predict stomatal conductance and WUE measured at different environmental conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science* 201: 81–94.
- Machado, A.F.L.; Ferreira, L.R.; Ferreira, F.A.; Fialho, C.M.T.; Tuffi-Santos, L.D.; Machado, M.S. 2006. Growth analysis of *Digitaria insularis*. *Planta Daninha* 24: 641–647.
- Medrano, H.; Tomás, M.; Martorell, S.; Flexas, J.; Hernández, E.; Rosselló, J.; Pou, A.; Escalona, J.M.; Bota, J. 2015. From leaf to whole-plant water use efficiency (WUE) in complex canopies: Limitations of leaf WUE as a selection target. *The Crop Journal* 3: 220–228.
- Orcaray, L.; Zulet, A.; Zabalza, A.; Royuela, M. 2012. Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide glyphosate. *Journal of Plant Physiology* 169: 27–33.
- R4P Network. 2016. Trends and challenges in pesticide resistance detection. *Trends in Plant Science* 21: 834–853.
- Sage, R.F. 2004. The evolution of C₄ photosynthesis. *New Phytology* 161: 341-370.
- Shaner, D.L. 1978. Effects of glyphosate on transpiration. *Weed Science* 26: 513-516.
- Shieh, W.J.; Geiger, D.R.; Serviates, J.C. 1991. Effect of N-(phosphonomethyl) glycine on carbon assimilation and metabolism during a simulated natural day. *Plant Physiology* 97: 1109–1114.

- Silveira, H.M.; Ferreira, E.A.; Silva, D.V.; Neto, M.D.C.; Carvalho, F.P.; Santos, J.B.; Silva, A.A. 2013. Physiological characteristics of cassava cultivars after mesotrione application. *Planta Daninha* 31: 403–409.
- Székács, A.; Darvas, B. 2012. Forty years with glyphosate. In: M.N. Hasaneen, editor, *Herbicides-properties, synthesis and control of weeds*. InTech, 247–284. doi: 424–43310.5772/32491
- Yannicari, M.; Tambussi, E.; Istilart, C.; Castro, A.M. 2012. Glyphosate effects on gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of two *Lolium perenne* L. biotypes with differential herbicide sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57: 210–217.
- Zhang, C.J.; Lim, S.H.; Kim, J.W.; Nah, G.; Fischer, A.; Kim, D.S. 2016. Leaf chlorophyll fluorescence discriminates herbicide resistance in *Echinochloa* species. *Weed Research* 56: 424–433.
- Zobiole, L.H.S.; Oliveira-Jr, R.S.; Kremer, R.J.; Constantin, J.; Bonato, C.M.; Muniz, A.S. 2010. Water use efficiency and photosynthesis of glyphosate-resistant soybean as affected by glyphosate. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 97: 182–193.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, a resistência a herbicidas é uma realidade para a maioria dos grandes agricultores do Brasil, sendo o glyphosate um dos herbicidas com mais casos de resistência. Contudo, este herbicida não deve ser retirado do sistema de produção devido ao seu amplo espectro de ação no controle de plantas daninhas, além do baixo perfil toxicológico ao meio ambiente e aos seres vivos.

Nesta pesquisa com biótipos de capim-amargoso, os resultados de dose-resposta concluíram que os biótipos MT e BA coletados em áreas de cultivo RR apresentaram resistência ao glyphosate. Enquanto que o biótipo de GO caracterizado como suscetível, possui alto potencial para desenvolver a resistência, pois apresentou falhas de controle em doses superiores a 720 g ha⁻¹. As alterações das características fisiológicas causadas pelo glyphosate em doses baixas (360 e 720 g ha⁻¹) foram evidentes entre os biótipos R e S de capim-amargoso. Já na dose usada amplamente pelos agricultores no campo (1440 g ha⁻¹, dose não recomendada para esta tecnologia pelo fabricante) ou superior, essas variáveis foram afetadas de forma similar e/ou quando houve diferenças nestas doses, não foi possível diferenciar os padrões fisiológicos entre os biótipos R e S, devido à grande variabilidade dentro dos indivíduos de um biótipo.

Portanto a confirmação da resistência sugere a necessidade de outros métodos de controle e/ou rotação de diferentes mecanismos de ação dos herbicidas. E a diagnose rápida e precisa da resistência é necessária para o manejo das populações e para a preservação da molécula dos herbicidas.