UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Controle químico e respostas ao glifosato em espécies de *Commelina* e mecanismos de resistência ao herbicida em *Digitaria insularis*

Dilma Francisca de Paula
Doctor Scientiae

VIÇOSA - MINAS GERAIS
2026

DILMA FRANCISCA DE PAULA

Controle químico e respostas ao glifosato em espécies de *Commelina* e mecanismos de resistência ao herbicida em *Digitaria insularis*

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

Orientador: Joao Carlos Cardoso Galvao

Coorientadores: Ricardo A. de La Cruz
Aristea Alves Azevedo
Mariana B. T. Diniz
Laryssa B. X. da Silva

VIÇOSA - MINAS GERAIS
2026

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T
P324c
2026

Paula, Dilma Francisca de, 1994-
Controle químico e respostas ao glifosato em espécies de *Commelina* e mecanismos de resistência ao herbicida em *Digitaria insularis* / Dilma Francisca de Paula. – Viçosa, MG, 2026.
1 tese eletrônica (99 f.): il. (algumas color.).

Orientador: João Carlos Cardoso Galvão.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Agronomia, 2026.
Inclui bibliografia.
DOI: https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2026.577
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Ervas daninhas - Controle. 2. Metabolismo secundário. 3. Resistência a herbicidas. I. Galvão, João Carlos Cardoso, 1962-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. III. Título.

CDD 22. ed. 632.954

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523

DILMA FRANCISCA DE PAULA

Controle químico e respostas ao glifosato em espécies de *Commelina* e mecanismos de resistência ao herbicida em *Digitaria insularis*

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

APROVADA: 17 de agosto de 2026.

Assentimento:

_____

Dilma Francisca de Paula
Autora

_____

Joao Carlos Cardoso Galvao
Orientador

Essa tese foi assinada digitalmente pela autora em 05/10/2026 às 20:02:19 e pelo orientador em 05/10/2026 às 21:25:00. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse https://siadoc.ufv.br/validar-documento. No campo 'Código de registro', informe o código **BW69.ED29.KI3M** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos e renovar minhas forças diante das dificuldades.

À minha família, pela presença e incentivo ao longo de toda essa jornada.

Ao meu orientador, professor Dr. João Carlos Cardoso Galvão, pela orientação, acolhimento e disponibilidade, decisivos para a realização deste doutorado.

Aos coorientadores Dra. Mariana Diniz e professores Laryssa Barbosa Xavier da Silva, Ricardo Alcántara-de la Cruz e Aristea Alves Azevedo, pelos ensinamentos, contribuições e acompanhamento durante o desenvolvimento deste trabalho.

Às professoras Ana Zabalza e Miriam Gil, pela receptividade durante o doutorado sanduíche na Espanha.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Agronomia (DAA) e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia (PPGFIT), pela estrutura oferecidas no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Grupo de Manejo Integrado de Plantas Daninhas (MIPD/UFV), por me acolher desde a graduação e contribuir de forma significativa para minha formação acadêmica e profissional. Aos funcionários Marllon, Julinho e Douglas, pela dedicação e contribuição nas atividades experimentais, e aos demais funcionários do departamento, especialmente Arlinda e Rubens, pelo acolhimento cotidiano.

Às amigas Elisa Gomes, Laryssa Xavier, Mariana Diniz, Grazielle Rodrigues, Ana Paiva e Jhersyka Paes, pela parceria, companheirismo e incentivo ao longo dessa trajetória. Vocês são essências na minha vida!

Aos membros do MIPD, meu grupo de pesquisa desde a graduação, com destaque ao Guilherme Paiva, pela disponibilidade em compartilhar conhecimentos em estatística.

Aos amigos da Anatomia Vegetal, João Tomaz e Victorina Aires, pela convivência e auxílio nos experimentos.

Aos estagiários que contribuíram para a execução dos experimentos, especialmente Yure Guidi e Vinicius Rocha.

À Lídia Nara Alves e à Tatiani Gomes, pela atenção e auxílio nas questões administrativas da pós-graduação.

Aos membros da banca de qualificação e defesa do doutorado, pelas valiosas contribuições e pelo tempo dedicado à avaliação deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 159133/2022-0, pela concessão da bolsa de estudos.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de

pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À mulher que me tornei.
Obrigada por nunca desistir dos seus sonhos.

RESUMO

PAULA, Dilma Francisca de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2026. **Controle químico e respostas ao glifosato em espécies de *Commelina* e mecanismos de resistência ao herbicida em *Digitaria insularis***. Orientador: Joao Carlos Cardoso Galvao. Coorientadores: Ricardo Alcantara de La Cruz, Aristea Alves Azevedo, Mariana Beatriz Teixeira Diniz e Laryssa Barbosa Xavier da Silva.

As plantas daninhas constituem um dos principais fatores limitantes da produtividade agrícola, e o uso intensivo do glifosato tem favorecido a persistência de espécies de difícil controle, como as do gênero *Commelina* e a evolução de biótipos resistentes ao herbicida, como *Digitaria insularis*. Dessa forma, os objetivos deste estudo foram: i) avaliar a eficácia de herbicidas aplicados isoladamente e em mistura no controle de espécies de *Commelina*, ii) investigar os efeitos do glifosato sobre o acúmulo de ácido chiquímico, a resposta dos compostos fenólicos e a anatomia foliar em *Commelina benghalensis* e *Commelina diffusa*, e iii) caracterizar os mecanismos de resistência ao glifosato associados ao sítio de ação em biótipos de *Digitaria insularis*. A eficácia de herbicidas no controle de espécies de *Commelina* foi avaliada em experimentos conduzidos em casa de vegetação, por meio de avaliações visuais de controle aos 28 e 60 dias após a aplicação (DAA) e da redução da massa seca da parte aérea. Os efeitos do glifosato em *C. benghalensis* e *C. diffusa* foram avaliados por meio da determinação do acúmulo de ácido chiquímico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), das respostas dos compostos fenólicos totais pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu e de análises anatômicas foliares. Em *Digitaria insularis*, a resistência ao glifosato foi caracterizada por curva de dose-resposta, determinação do acúmulo de ácido chiquímico, sequenciamento do gene *EPSPS* e quantificação do número de cópias desse gene por qPCR. A eficácia dos herbicidas variou entre as espécies de *Commelina*, com diferenças interespecíficas nas respostas de controle. Em *C. benghalensis*, triclopir, triclopir + glifosato e 2,4-D + saflufenacil proporcionaram os maiores níveis de controle e redução da biomassa. Em *C. diffusa*, triclopir, carfentrazona + glifosato e saflufenacil + glifosato foram os mais eficientes no controle. *C. erecta* apresentou maior sensibilidade aos herbicidas, sendo controlada por 2,4-D, dicamba, triclopir, flumioxazina, glufosinato de amônio e pela maioria das misturas com glifosato. As misturas de herbicidas apresentaram interações aditivas, sinérgicas e antagônicas, demonstrando que a resposta às associações depende da espécie e da combinação de herbicidas. A mistura flumioxazina + glifosato foi a única que apresentou efeito antagônico nas três espécies avaliadas. O glifosato promoveu

acúmulo de ácido chiquímico em *C. benghalensis* e *C. diffusa*. O herbicida reduziu os compostos fenólicos, principalmente em folhas expandidas, e promoveu alterações anatômicas caracterizadas por clorose, necrose, deformações estomáticas, redução da espessura da cutícula, hiperplasia do mesofilo e danos aos feixes vasculares. Em conjunto, esses resultados evidenciaram que a resposta ao glifosato envolve alterações bioquímicas e estruturais, mesmo em espécies tolerantes, e instiga estudos futuros para avaliar os mecanismos fisiológicos que permitem a espécie sobreviver ao glifosato. Os biótipos de *Digitaria insularis* apresentaram baixo fator de resistência ao glifosato. A resistência foi explicada pela ocorrência simultânea da mutação Pro106Thr e do aumento do número de cópias do gene *EPSPS*, caracterizando mecanismos de resistência relacionados ao sítio de ação. Assim, os resultados ampliam o conhecimento sobre a resposta de importantes plantas daninhas ao glifosato, identificam alternativas mais eficientes para o manejo de espécies de *Commelina* e reforçam a importância do desenvolvimento de estratégias destinadas a retardar a evolução da resistência aos herbicidas.

Palavras-chave: alterações estruturais; manejo químico; metabolismo secundário; mecanismo de ação ; plantas daninhas; resistência; herbicidas; sítio-alvo.

ABSTRACT

PAULA, Dilma Francisca de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2026. **Chemical control and responses to glyphosate in *Commelina* species and herbicide resistance mechanisms in *Digitaria insularis***. Adviser: Joao Carlos Cardoso Galvao. Co-advisers: Ricardo Alcantara de La Cruz, Aristea Alves Azevedo, Mariana Beatriz Teixeira Diniz and Laryssa Barbosa Xavier da Silva.

Weeds are among the major factors limiting agricultural productivity, and the intensive use of glyphosate has favored the persistence of difficult-to-control species, such as those of the genus *Commelina*, as well as the evolution of herbicide-resistant biotypes, such as *Digitaria insularis*. Therefore, the objectives of this study were to: i) evaluate the efficacy of herbicides applied alone and in mixtures for the control of *Commelina* species; ii) investigate the effects of glyphosate on shikimic acid accumulation, phenolic compound responses, and leaf anatomy in *Commelina benghalensis* and *Commelina diffusa*; and iii) characterize glyphosate resistance mechanisms associated with the target site in *Digitaria insularis* biotypes. The efficacy of herbicides for the control of *Commelina* species was evaluated in greenhouse experiments through visual assessments of control at 28 and 60 days after application (DAA) and reductions in shoot dry matter. The effects of glyphosate on *C. benghalensis* and *C. diffusa* were evaluated by determining shikimic acid accumulation using high-performance liquid chromatography (HPLC), assessing total phenolic compounds using the Folin–Ciocalteu spectrophotometric method, and performing leaf anatomical analyses. In *D. insularis*, glyphosate resistance was characterized through dose-response curves, determination of shikimic acid accumulation, *EPSPS* gene sequencing, and quantification of *EPSPS* gene copy number by qPCR. Herbicide efficacy varied among *Commelina* species, with interspecific differences in control responses. In *C. benghalensis*, triclopyr, triclopyr + glyphosate, and 2,4-D + saflufenacil provided the highest levels of control and biomass reduction. In *C. diffusa*, triclopyr, carfentrazone + glyphosate, and saflufenacil + glyphosate were the most effective treatments. *C. erecta* showed greater sensitivity to herbicides and was controlled by 2,4-D, dicamba, triclopyr, flumioxazin, glufosinate-ammonium, and most glyphosate mixtures. Herbicide mixtures exhibited additive, synergistic, and antagonistic interactions, demonstrating that responses to mixtures depend on both the species and the herbicide combination. The flumioxazin + glyphosate mixture was the only treatment that showed an antagonistic effect across all three evaluated species. Glyphosate promoted shikimic acid accumulation in *C. benghalensis* and *C. diffusa*.

The herbicide reduced phenolic compounds, particularly in expanded leaves, and induced anatomical changes characterized by chlorosis, necrosis, stomatal deformities, reduced cuticle thickness, mesophyll hyperplasia, and damage to vascular bundles. Overall, these results demonstrate that the response to glyphosate involves biochemical and structural alterations, even in tolerant species, and highlight the need for further studies to evaluate the physiological mechanisms that enable these species to survive glyphosate exposure.

Digitaria insularis biotypes showed a low resistance factor to glyphosate. Resistance was explained by the simultaneous occurrence of the Pro106Thr mutation and an increased number of *EPSPS* gene copies, characterizing target-site resistance mechanisms. Thus, these results expand the knowledge of the responses of important weed species to glyphosate, identify more effective alternatives for the management of *Commelina* species, and reinforce the importance of developing strategies aimed at delaying the evolution of herbicide resistance.

Keywords: Structural changes; Chemical management; Secondary metabolism; Mode of action; Weeds; Resistance; Herbicides; Target site

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....13
OBJETIVOS.....15
Objetivo Geral.....15
Objetivos específicos.....15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....16
CAPÍTULO 1.....19
MISTURAS DE HERBICIDAS PARA O CONTROLE DE ESPÉCIES DE *Commelina*: EFICÁCIA E EFEITOS DE INTERAÇÃO.....19
RESUMO.....19
1.1 Introdução.....20
1.2 Material e Métodos.....21
1.2.1 Coleta e plantio das mudas de *C. benghalensis, C. diffusa* e *C. erecta*.....21
1.2.2 Delineamento experimental e tratamentos.....22
1.2.3 Avaliação da injúria e redução da biomassa.....23
1.2.4 Análise estatística.....24
1.3 Resultados.....24
1.3.1 Controle de espécies de *Commelina* spp. com herbicidas aplicados isoladamente.....24
1.3.2 Controle de espécies de *Commelina* spp. com misturas de herbicidas.....27
1.3.3 Redução de biomassa seca de espécies de *Commelina* spp.....30
1.4 Discussão.....32
1.4.1 Controle de espécies de *Commelina* spp. com herbicidas aplicados isoladamente.....32
1.4.2 Controle de espécies de *Commelina* spp. com misturas de herbicidas.....33
1.4.3 Redução de biomassa seca de espécies de *Commelina* spp.....35
1.5 Conclusão.....36
1.6 Referências bibliográficas.....37
CAPÍTULO 2.....43
GLIFOSATO ALTERA OS TEORES DE ÁCIDO CHIQUÍMICO E DE COMPOSTOS FENÓLICOS E A ANATOMIA FOLIAR EM ESPÉCIES TOLERANTES DE *Commelina*.....43
RESUMO.....43

2.1 Introdução.....44
2.2 Material e Métodos.....45
2.2.1 Obtenção de mudas e Condições de crescimento das plantas.....45
2.2.2 Aplicação de glifosato.....46
2.2.3 Definição da C_{80} e GR_{80} baseada em curva dose-resposta.....46
2.2.4 Coleta e processamento de amostras para análise anatômica e histoquímica.....47
2.2.5 Extração de ácido chiquímico.....48
2.2.6 Métodos de determinação por HPLC.....48
2.2.6.1 Condições cromatográficas.....48
2.2.6.2 Validação do método cromatográfico para detecção e quantificação de ácido chiquímico.....48
2.2.6.3 Seletividade.....49
2.2.6.4 Resolução Analítica.....49
2.2.6.5 Linearidade.....49
2.2.6.6 Exatidão.....49
2.2.6.7 Precisão.....50
2.2.7 Análise comparativa de compostos fenólicos totais.....50
2.2.8 Microscopia eletrônica de varredura.....51
2.2.9 Análise estatística.....51
2.3 Resultados.....51
2.3.1 Curva-dose resposta de *C. diffusa* e *C. benghalensis* ao glifosato.....51
2.3.2 Validação do método de HPLC para ácido chiquímico.....52
2.3.3 Quantificação de ácido chiquímico 53
2.3.4 Glifosato reduz a concentração de fenólicos totais em *Commelina diffusa* e *Commelina benghalensis*.....54
2.3.5 Glifosato altera a morfologia foliar externa e interna de *C. diffusa* e *C. benghalensis*.....57
2.4 Discussão.....62
2.5 Conclusão.....65
2.6 Referências bibliográficas.....66
CAPÍTULO 3.....73

RESISTÊNCIA AO GLIFOSATO NO SÍTIO-ALVO EM *Digitaria insularis*: EVIDÊNCIAS DA MUTAÇÃO PRO106THR E DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE *EPSPS*……73
RESUMO…...……...73
3.1 Introdução……74
3.2 Material e Métodos……..75
3.2.1 Material vegetal……..……..75
3.2.2 Avaliação do fator de resistência (FR)……76
3.2.3 Condições de Cultivo das Plantas para análises bioquímicas e moleculares.77
3.2.4 Acúmulo de ácido chiquímico……78
3.2.5 Extração de DNA……..78
3.2.6 Determinação do número de cópias do gene *EPSPS*……...79
3.2.7 Sequenciamento do gene *EPSPS*.....79
3.2.8 Análise estatística…….....80
3.3 Resultados 80
3.3.1 Fator de resistência ao glifosato.....80
3.3.2 Resposta do acúmulo de ácido chiquímico ao glifosato…….83
3.3.3 Número de cópias do gene *EPSPS*.....84
3.3.4 Mutação no gene *EPSPS*……..85
3.4 Discussão……86
3.5 Conclusão……90
3.6. Referências bibliográficas……91
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS...……....99

INTRODUÇÃO GERAL

O glifosato é o herbicida mais utilizado no mundo devido ao amplo espectro de controle, elevada eficácia e à ampla adoção de culturas geneticamente modificadas resistentes a esse herbicida. Contudo seu uso intensivo, ao longo de décadas, tem favorecido a persistência de espécies tolerantes e a evolução de biótipos resistentes, aumentando a complexidade do manejo de plantas daninhas (Procópio et al., 2024; Alcántara-de la Cruz et al., 2026).

Commelina benghalensis, *C. diffusa* e *C. erecta* apresentam tolerância ao glifosato. A persistência dessas espécies em culturas anuais e perenes está associada à elevada capacidade de adaptação, à produção de sementes e à propagação vegetativa, características que favorecem sua sobrevivência e disseminação. Além disso, atuam como hospedeiras de pragas e apresentam elevado teor de água nos caules, o que dificulta as operações de colheita e amplia os prejuízos agronômicos causados por sua infestação (Trezzi et al., 2015; Damião et al., 2021; Isaac, 2013).

O controle químico de espécies do gênero *Commelina* apresenta limitações devido à baixa eficácia de diversos herbicidas quando aplicados isoladamente, principalmente em estágios avançados de desenvolvimento, em razão da capacidade de rebrota (Freitas et al., 2018). Diante disso, o uso de misturas de herbicidas é uma alternativa para ampliar o espectro de controle e reduzir a pressão de seleção imposta pelo uso repetitivo de um único mecanismo de ação. Entretanto, as respostas às misturas depende da combinação de herbicidas e pode resultar em efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos, o que reforça a necessidade de estudos que identifiquem associações mais eficazes para o manejo dessas plantas (Bottcher et al., 2022; Zambrini et al., 2025).

Além da identificação de alternativas para o controle químico, a avaliação dos efeitos do glifosato constitui outro aspecto relevante**.** O herbicida inibe a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), comprometendo a via do ácido chiquímico e a síntese de aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano (Duke & Powles, 2008). Como consequência, ocorre acúmulo de ácido chiquímico, alterações na produção de compostos fenólicos e modificações estruturais nos tecidos vegetais em plantas sensíveis (Amrhein et al., 1980; Tuffi et al., 2009). Entretanto, ainda são escassas as avaliações sobre essas respostas em espécies do gênero

Commelina. A caracterização do acúmulo de ácido chiquímico, das alterações nos compostos fenólicos e da anatomia foliar amplia o conhecimento sobre os efeitos do glifosato nessas espécies e contribui para compreender as alterações bioquímicas e estruturais induzidas pelo herbicida.

A evolução de biótipos resistentes contitue outro importante desafio associado ao uso do glifosato. *Digitaria insularis* está entre as principais plantas daninhas em áreas cafeeiras do Brasil, onde infestações de 16 plantas por m^2 podem reduzir a produtividade do cafeeiro em até 41% (Amaral et al., 2023; Heap, 2024). Essa espécie apresenta elevada capacidade de adaptação, associada à alta produção de sementes facilmente dispersas pelo vento e à reprodução por rizomas, características que favorecem sua disseminação e dificultam o controle (Souza et al., 2024).

Diferentes mecanismos podem conferir resistência ao glifosato em *Digitaria insularis*. Entre os mecanismos associados ao sítio de ação, estão as mutações no gene *EPSPS* e o aumento no número de cópias desse gene (Amaral et al., 2023). Essas alterações mantêm a atividade da enzima EPSPS mesmo na presença do herbicida (Alcántara-de la Cruz et al., 2026). A identificação desses mecanismos contribui para compreender a evolução da resistência em biótipos de *D. insularis* e fornece informações para o monitoramento da resistência ao glifosato.

A complexidade do manejo de plantas daninhas exige abordagens integradas que considerem a eficácia do controle químico, as respostas das plantas aos herbicidas e os mecanismos envolvidos na evolução da resistência. Nesse contexto, o trabalho avalia alternativas para o controle químico de espécies do gênero *Commelina*, investiga os efeitos do glifosato sobre o acúmulo de ácido chiquímico, os compostos fenólicos e a anatomia foliar dessas espécies, e caracteriza mecanismos de resistência ao glifosato associados ao gene *EPSPS* em biótipos de *Digitaria insularis*. Os resultados buscam ampliar o conhecimento sobre a resposta das plantas daninhas ao glifosato e fornecem bases para futuras pesquisas que busquem o aperfeiçoamento das estratégias de manejo.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a eficácia de herbicidas aplicados isoladamente e em mistura, analisar os efeitos da aplicação de glifosato, no acúmulo de ácido chiquímico, alterações em compostos fenólicos e danos anatômicos em espécies do gênero *Commelina*, e caracterizar a resistência ao glifosato associada ao sítio de ação em *Digitaria insularis*.

Objetivos específicos

- Avaliar a eficácia de herbicidas aplicados isoladamente e em misturas no controle de *Commelina benghalensis*, *C. diffusa* e *C. erecta*.
- Identificar interações entre herbicidas (sinérgicas, aditivas ou antagônicas).
- Identificar, dentro de um mesmo mecanismo de ação, quais herbicidas mantêm maior eficácia de controle em avaliações tardias (60 DAA).
- Quantificar o acúmulo de ácido chiquímico após a aplicação de glifosato em *Commelina benghalensis*, *C. diffusa.*
- Avaliar alterações nos teores de compostos fenólicos totais em *Commelina benghalensis*, *C. diffusa.*
- Analisar os danos anatômicos causados pela aplicação de glifosato *Commelina benghalensis*, *C. diffusa.*
- Determinar o nível de resistência ao glifosato em biótipos de *Digitaria insularis*. coletados em lavouras cafeeiras da Zona da Mata Mineira, com base no fator de resistência.
- Identificar mutações no gene *EPSPS.*
- Estimar o número relativo de cópias do gene *EPSPS* por qPCR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcántara-de la Cruz, R.; Guidi, Y. M.; Ramírez-Castillo, M.; Adegas, F. S.; Carbonari, C. A.; Velini, E. D.; De Prado, R.; Duke, S. O. Thirty Years of Glyphosate-Resistant Crops and Weeds: Current Situation and Future Prospects. **Pest Management Science**, v. 82, p. 5987–6009, 2026. https://doi.org/10.1002/ps.70742.

Amaral, G. S.; Silveira, H. M.; Mendes, K. F.; Silva, A. J.; Silva, M. F.; Carbonari, C. A.; & la Cruz, R. A. D. Herbicide resistance status of sourgrass. **Advances in Weed Science**, v. 41, p. e020230028, 2023. https://doi.org/10.51694/AdvWeedSci/2023;41:00024.

Amrhein, N.; Deus, B.; Gehrke, P.; Steinrücken, H. C. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. **Plant Physiology**, v. 66, p. 830–834, 1980. https://doi.org/10.1104/pp.66.5.830.

Beckie, H. J.; & Harker, K. N. Our top 10 herbicide-resistant weed management practices. **Pest management science**, v. 73, p. 1045-1052, 2017. https://doi.org/10.1002/ps.4543.

Bottcher, A. A.; Albrecht, A. J. P.; Albrecht, L. P.; Kashivaqui, E. S. F.; Cassol, M.; Souza, C. N. Z. D.; ... & Silva, A. F. M. Herbicide efficacy in the fall management of *Richardia brasiliensis*, *Commelina benghalensis*, *Conyza sumatrensis* and *Digitaria insularis*. **Biosci J**, v. 38, p. e38025, 2022. https://doi.org/10.14393/BJ-v38n0a2022-53544.

Damião, V.; Barroso, A.A.M.; Alves, P.L.D.C.; Lemos, L.B. Consorciação de milho e culturas de sucessão altera a comunidade de plantas daninhas em feijão comum sob plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 50, p. e65244, 2021. https://doi.org/10.1590/1983-40632020v5065244.

Duke, S. O.; & Powles, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 64, p. 319-325, 2008. https://doi.org/10.1002/ps.1518.

Freitas, N.; Freitas, F.; Furtado, I.; Teixeira, M.; Silva, V. Misturas de Herbicidas para o Controle da Trapoeraba e o Efeito da Deriva na Cultura do Café. **Planta Daninha**, v. 36, p. e018169798, 2018. https://doi.org/10.1590/S0100-83582018360100047.

HEAP, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. 2024. http://www.weedscience.org.

Isaac, W.A.; Gao, Z.; Li, M. **Managing Commelina species: Prospects and limitations**. 1 ed. London: IntechOpen, 2013.

Ofosu, R.; Agyemang, E. D.; Márton, A.; Pásztor, G.; Taller, J.; & Kazinczi, G. Herbicide resistance: managing weeds in a changing agricultural environment. **Agronomy**, v. 13, p.1595, 2023. https://doi.org/10.3390/agronomy13061595.

Procópio, S. D. O.; Barizon, R. R. M.; Pazianotto, R. A. A.; Morandi, M. A. B.; Braz, G. B. P. Impacts of weed resistance to glyphosate on herbicide commercialization in Brazil. **Agriculture**, v. 14, p. 2315, 2024. https://doi.org/10.3390/agriculture14122315.

Riechers, D. E.; Soltani, N.; Chauhan, B. S.; Concepcion, J. C. T.; Geddes, C. M.; Jugulam, M. & Sikkema, P. H. Herbicide resistance is complex: a global review of cross-resistance in weeds within herbicide groups. **Weed Science**, v. 72, p. 465-486, 2024. https://doi.org/10.1017/wsc.2024.33.

Souza, A. P. D.; Alves, J. F.; Inokuti, E. M.; Garcia, F.; Ferreira, B. W.; Nobrega, T. F. D.; ... & Moreira, C. C. Anthracocystis panici-leucophaei: A Potential Biological Control Agent for the Grassy Weed *Digitaria insularis*. **Agronomy**, v. 14, p. 2926, 2024. https://doi.org/10.3390/agronomy14122926.

Trezzi, M.M.; Vidal, R.A.; Patel, F.; Miotto, E.; Debastiani, F.; Balbinot, A.A. Mosquen, R. Impact of *Commelina benghalensis* density and establishment period on soyabean grain yield, yield components and economic threshold. **Weed Research**, v. 55, p. 34-41, 2015. 10.1111/wre.12125.

Tuffi Santos, L. D.; Sant'Anna-Santos, B. F.; Meira, R. M. S. A.; Ferreira, F. A.; Tiburcio, R. A. S.; & Machado, A. F. L. Leaf anatomy and morphometry in three eucalypt clones treated with glyphosate. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, p. 129-136, 2009. https://doi.org/10.1590/S1519-69842009000100016 .

Zambrini, C. I.; Albrecht, A. J. P.; Albrecht, L. P.; Migliavacca, R. A.; Silva, A. F. M.; & Zobiole, L. H. S. Efficacy of florpyrauxifen-benzyl and other herbicides in the control of *Commelina benghalensis*. **Revista Ceres**, v. 72, p. e72012, 2025. https://doi.org/10.71252/2177-34912025720012.

CAPÍTULO 1

MISTURAS DE HERBICIDAS PARA O CONTROLE DE ESPÉCIES DE *Commelina*: EFICÁCIA E EFEITOS DE INTERAÇÃO

RESUMO: *Commelina benghalensis*, *Commelina diffusa* e *Commelina erecta* são plantas daninhas de difícil controle que apresentam tolerância ao glifosato. Este estudo avaliou a eficácia de herbicidas aplicados isoladamente e em misturas para o controle dessas espécies. Os tratamentos consistiram em glifosato (720 g e.a.), 2,4-D (800 g e.a.), carfentrazona (30 g i.a.), saflufenacil (48 g i.a.), dicamba (650 g e.a.), oxifluorfeno (1000 g i.a.), sulfentrazona (200 g i.a.), metsulfurom-metílico (10 g i.a.), flumioxazina (90 g i.a.), triclopir (720 g i.a.), fomesafem (200 g i.a.), glufosinato de amônio (500 g i.a.), misturas de glifosato com cada herbicida e a associação 2,4-D + saflufenacil. O controle visual foi avaliado aos 28 e 60 dias após a aplicação (DAA), e a redução da biomassa seca foi determinada aos 60 DAA. Para *C. benghalensis*, triclopir, triclopir + glifosato e 2,4-D + saflufenacil proporcionaram controle superior a 90% e redução da biomassa superior a 70%. Para *C. diffusa*, os maiores níveis de controle (>95%) e redução da biomassa (>80%) foram obtidos com triclopir, carfentrazona + glifosato e saflufenacil + glifosato. Para *C. erecta*, 2,4-D, dicamba, triclopir, flumioxazina, glufosinato de amônio e diversas misturas com glifosato proporcionaram os maiores níveis de controle e redução da biomassa. A eficácia dos herbicidas aplicados isoladamente e em misturas variou entre as espécies de *Commelina*, destacando a importância de estratégias de controle específicas para cada espécie e a necessidade de considerar as interações entre herbicidas no desenvolvimento de programas de manejo.

Palavras-chave: Glifosato, mecanismo de ação, sinergismo, propagação vegetativa.

1.1 Introdução

As espécies *Commelina benghalensis*, *C. diffusa* e *C. erecta* (Irakiza et al., 2022) constituem importantes plantas daninhas nas culturas da soja (Trezzi et al., 2015), arroz (Nisensohn et al., 2011), eucalipto (Costa et al., 2021), café (Daba et al., 2022), guaraná (Soares et al., 2019) e feijão (Damião et al., 2021). Essas espécies competem com as culturas por recursos ambientais, atuam como hospedeiras de pragas e patógenos e dificultam a colheita (Isaac, 2013), reduzindo a produtividade.

As espécies de *Commelina* são plantas daninhas de difícil controle devido à tolerância ao glifosato e à capacidade de reprodução vegetativa, que reduz a eficácia do controle mecânico e favorece sua disseminação (Hamid et al., 2019; Nampy et al., 2023). O controle químico representa o método mais utilizado para o manejo dessas espécies, principalmente em razão do baixo custo e da facilidade de aplicação em grandes áreas (Silva et al., 2024). Entretanto, herbicidas aplicados isoladamente, como carfentrazona, flumioxazina e glufosinato de amônio, apresentam baixa eficácia em estádios mais avançados de desenvolvimento devido à elevada capacidade de rebrota dessas plantas (Santos et al., 2002; Vicensi et al., 2024).

As misturas de herbicidas têm sido utilizadas com sucesso no controle de outras espécies de difícil manejo e tolerantes ao glifosato, como *Ipomoea grandifolia*, com a mistura glifosato + flumioxazina (Rocha et al., 2021), e *Spermacoce* spp., com glifosato + saflufenacil ou glifosato + carfentrazona (Castro et al., 2021). Dessa forma, a aplicação de misturas de herbicidas pode representar uma alternativa eficiente para superar a baixa eficácia observada quando esses produtos são aplicados isoladamente no controle de espécies de *Commelina*.

As misturas de herbicidas podem ampliar o espectro de controle, diminuir a persistência de espécies tolerantes, reduzir a pressão de seleção de biótipos resistentes e possibilitar a utilização de menores doses de aplicação, minimizando o risco de *carryover* (Abbas et al., 2016; Renton et al., 2024). No entanto, a combinação de diferentes moléculas herbicidas pode resultar em variações na eficácia de controle, gerando efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos. Por essa razão, estudos que avaliem a natureza das interações entre herbicidas são fundamentais para identificar as combinações mais eficientes (Maciel et al., 2020).

Embora diversos estudos tenham relatado a eficácia de herbicidas e de suas misturas para espécies individuais de *Commelina* (Ronchi et al., 2002; Carneiro et al., 2025; Larini et al., 2025), ainda são escassos os trabalhos que avaliam *C. benghalensis*, *C. diffusa* e *C. erecta* sob condições experimentais semelhantes. A maioria dos estudos disponíveis avaliou apenas uma espécie ou um número limitado de combinações de herbicidas. Além disso, as informações sobre interações aditivas, sinérgicas e antagônicas e sobre a persistência do controle ao longo do tempo ainda são limitadas. Essas informações podem contribuir para o aprimoramento do controle de espécies do gênero *Commelina*.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia de diferentes herbicidas, aplicados isoladamente e em misturas, como alternativa para o controle de *C. benghalensis*, *C. diffusa* e *C. erecta*.

1.2 Material e métodos

1.2.1 Coleta e plantio das mudas de *C. benghalensis*, *C. diffusa* e *C. erecta*

Foram conduzidos três experimentos em casa de vegetação, um para cada espécie estudada. Mudas de *C. benghalensis*, *C. diffusa* e *C. erecta* foram coletadas na Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil (20°46'06.2" S, 42°52'12.2" W), em uma área com histórico de aplicação de glifosato. A propagação foi realizada utilizando estruturas vegetativas contendo um par de folhas. Cada unidade experimental foi constituída por um vaso com capacidade para 3,5 L, preenchido com solo e contendo três mudas da respectiva espécie. Os vasos foram irrigados duas vezes ao dia, mantendo a umidade do solo próxima a capacidade de campo.

O solo utilizado no experimento foi classificado como Latossolo (Tabela 1.1). Aos 30 e 70 dias após o transplantio (DAT), foi realizada adubação de cobertura com 3,5 g de fertilizante N-P-K (20-05-20) por vaso.

Tabela 1.1. Característica físico-química do Latossolo:

Atributos químicos									
Solo	MO	pH	P	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Al^{3+}	H+Al	CTC
	%	(H_2O)	--mg dm^{-3}-		----------$cmol_c$ dm^{-3}----------				
Latossolo	2,3	6,5	2,1	160	3,33	0,68	0,0	1,65	6,0

Atributos físicos				
Solo	Argila	Silte	Areia	Textura
	----------%			
Latossolo	49	13	38	franco-argilosa

MO: Matéria Orgânica, pH: Potencial hidrogeniônico, CTC: Capacidade de troca de Cátions, Fonte: Laboratório de Análise de Solos da Universidade Federal de Viçosa, segundo a metodologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (Teixeira, 2017).

1.2.2 Delineamento experimental e tratamentos

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com avaliação de 24 tratamentos (Tabela 1.2), cada um com quatro repetições. Foram incluídas testemunhas sem aplicação de herbicidas para cada espécie.

Tabela 1.2. Herbicidas e misturas de herbicidas avaliados para o controle de *Commelina benghalensis*, *C. diffusa* e *C. erecta*.

Tratamentos	**Dose (g i.a. ha^{-1})**	**Formulação #**	**Mecanismo de ação/Grupo HRAC‡**
Isolados			
Metsulfurom-metílico	10	GM	ALS/2
2,4-D*	800	CE	AUX/4
Dicamba*	650	LS	AUX/4
Triclopir	720	CE	AUX/4
Glifosato*	720	LS	EPSPs/9
Glufosinato de amônio	500	LS	GS/10
Carfentrazona	30	CE	PROTOX/14
Flumioxazina	60	GM	PROTOX/14
Fomesafem	300	CS	PROTOX/14
Oxifluorfeno	1000	CE	PROTOX/14
Saflufenacil	48	CS	PROTOX/14
Sulfentrazona	200	CS	PROTOX/14
Misturas			
Metsulfurom + Glifosato	10 + 720	GM+ LS	ALS + EPSPs
2,4-D + Glifosato	800 + 720	CE + LS	AUX + EPSPs

Dicamba + Glifosato	650 + 720	LS + LS	AUX + EPSPs
Triclopir + Glifosato	720 + 720	CE + LS	AUX + EPSPs
Glufosinato + Glifosato	500 + 720	LS + LS	GS + EPSPs
Carfentrazona + Glifosato	30 + 720	CE + LS	PROTOX + EPSPs
Flumioxazina + Glifosato	60 + 720	GM + LS	PROTOX + EPSPs
Fomesafem + Glifosato	300 + 720	CS + LS	PROTOX + EPSPs
Oxifluorfeno + Glifosato	1000 + 720	CE + LS	PROTOX + EPSPs
Saflufenacil + Glifosato	48 + 720	CS + LS	PROTOX + EPSPs
Sulfentrazona + Glifosato	200 + 720	CS + LS	PROTOX + EPSPs
2,4-D + Saflufenacil	800 + 48	CE + CS	AUX + PROTOX

*Dosagem dada em equivalente ácido (e.a.); # LS – Líquido solúvel**;** CE – Concentrado emulsionável**;** CS – Concentrado de suspensão; GDA – Grânulo dispersível em água (ou GM – Grânulo molhável); ‡ EPSPS – 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase**;** AUX – Auxina sintética**;** PROTOX – Inibidor da protoporfirinogênio oxidase**;** GS – Inibidor da glutamina sintetase**;** ALS – Inibidor da acetolactato sintase**.**

Aos 60 dias após o transplantio (DAT), as plantas foram podadas e padronizadas para uma altura de 10 cm. Quarenta dias depois, quando atingiram aproximadamente 35 cm de altura, realizou-se a aplicação dos herbicidas.

A aplicação foi realizada com pulverizador costal pressurizado por CO_2, equipado com barra contendo duas pontas de pulverização TT 11002, espaçadas em 50 cm. O volume de calda utilizado foi de 180 L ha^{-1}, com válvula reguladora de pressão constante ajustada para 300 kPa. A pulverização foi realizada a 50 cm do alvo, sob condições ambientais de 80% de umidade relativa do ar, temperatura de 27 °C e céu nublado.

1.2.3 Avaliação da injúria e redução da biomassa

As avaliações visuais de controle das espécies de *Commelina* foram realizadas aos 28 e 60 dias após a aplicação (DAA). O controle foi estimado por meio de uma escala percentual, com notas variando de 0% (ausência de sintomas) a 100% (morte da planta). Valores iguais ou superiores a 80% foram considerados indicativos de controle satisfatório (Vanhala et al., 2004).

Aos 60 DAA, a biomassa da parte aérea foi coletada, acondicionada em sacos de papel e seca em estufa de circulação forçada de ar a 70 ºC por 48 horas. Após a secagem, determinou-se a massa seca das plantas daninhas em balança analítica de precisão (± 0,0001 g).

1.2.4 Análise estatística

Os dados de controle aos 28 e 60 DAA, assim como os de biomassa seca das espécies do gênero *Commelina* foram submetidos à ANOVA separadamente para os tratamentos com herbicidas isolados e para as misturas de herbicidas. Quando foi identificada diferença significativa ($p \leq 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de agrupamento de médias Skott Knott ($p \leq 0,05$) no programa R Studio (R Core Team, 2019) usando o pacote ExpDes.pt (Ferreira et al. 2014). Os dados foram plotados no software Sigma Plot 11.0.

As interações entre os herbicidas foram avaliadas a partir dos dados obtidos aos 28 e 60 DAA, utilizando a equação de Colby (1967): $E = X + Y - (XY/100)$, em que E representa o efeito esperado da mistura (em % de controle ou inibição), X é o efeito observado do herbicida aplicado isoladamente e Y é o efeito observado do segundo herbicida também aplicado de forma isolada. O valor estimado por essa equação corresponde ao efeito aditivo esperado, ou seja, em condições de ausência de interação entre os herbicidas. Quando o efeito observado da mistura foi superior ao valor estimado, a interação foi considerada sinérgica; e quando inferior, antagônica (Colby, 1967). As médias dos valores observados e estimados foram comparados pelo teste T de Student a 5% de probabilidade.

1.3 Resultados

1.3.1 Controle de espécies de *Commelina* spp. com herbicidas aplicados isoladamente

A eficácia dos herbicidas aplicados isoladamente variou de acordo com a espécie de *Commelina* e o período de avaliação (28 e 60 dias após a aplicação – DAA). O glifosato apresentou a menor eficácia entre os tratamentos para as três espécies, com níveis de controle inferiores a 20% (Figura 1.1).

Commelina benghalensis foi a espécie menos sensível aos herbicidas avaliados. Apenas os herbicidas mimetizadores de auxina (2,4-D, dicamba e triclopir) proporcionaram níveis de controle superiores a 80% em ambas as avaliações, apresentando os maiores percentuais de controle. Para a maioria dos herbicidas, a

eficácia aumentou entre 15% e 30% da primeira para a segunda avaliação. As exceções foram flumioxazina e metsulfurom-metílico, cujos níveis de controle reduziram entre 10% e 15%. Ainda assim, os percentuais de controle permaneceram abaixo do limite considerado satisfatório (80%) (Figura 1.1).

Commelina diffusa foi a espécie mais sensível aos herbicidas. A maioria dos tratamentos apresentou níveis de controle superiores a 80% a partir de 28 DAA. Embora a eficácia tenha diminuído ligeiramente aos 60 DAA, a maior parte dos herbicidas manteve controle satisfatório. As exceções foram carfentrazona, fomesafem e oxifluorfeno, cujos níveis de controle reduziram de 95–100% para 65–75%, resultando nos menores percentuais de controle, juntamente com o glifosato (Figura 1.1).

Commelina erecta apresentou resposta intermediária aos 28 DAA, com sete herbicidas proporcionando controle superior a 80%. Carfentrazona, fomesafem, oxifluorfeno e saflufenacil apresentaram níveis de controle entre 40% e 64%. Aos 60 DAA, esses quatro herbicidas aumentaram sua eficácia e atingiram controle satisfatório. Em contrapartida, sulfentrazona e metsulfurom-metílico perderam eficácia ao longo do período de avaliação, com redução do controle de 90–93% para 45–68% (Figura 1.1).

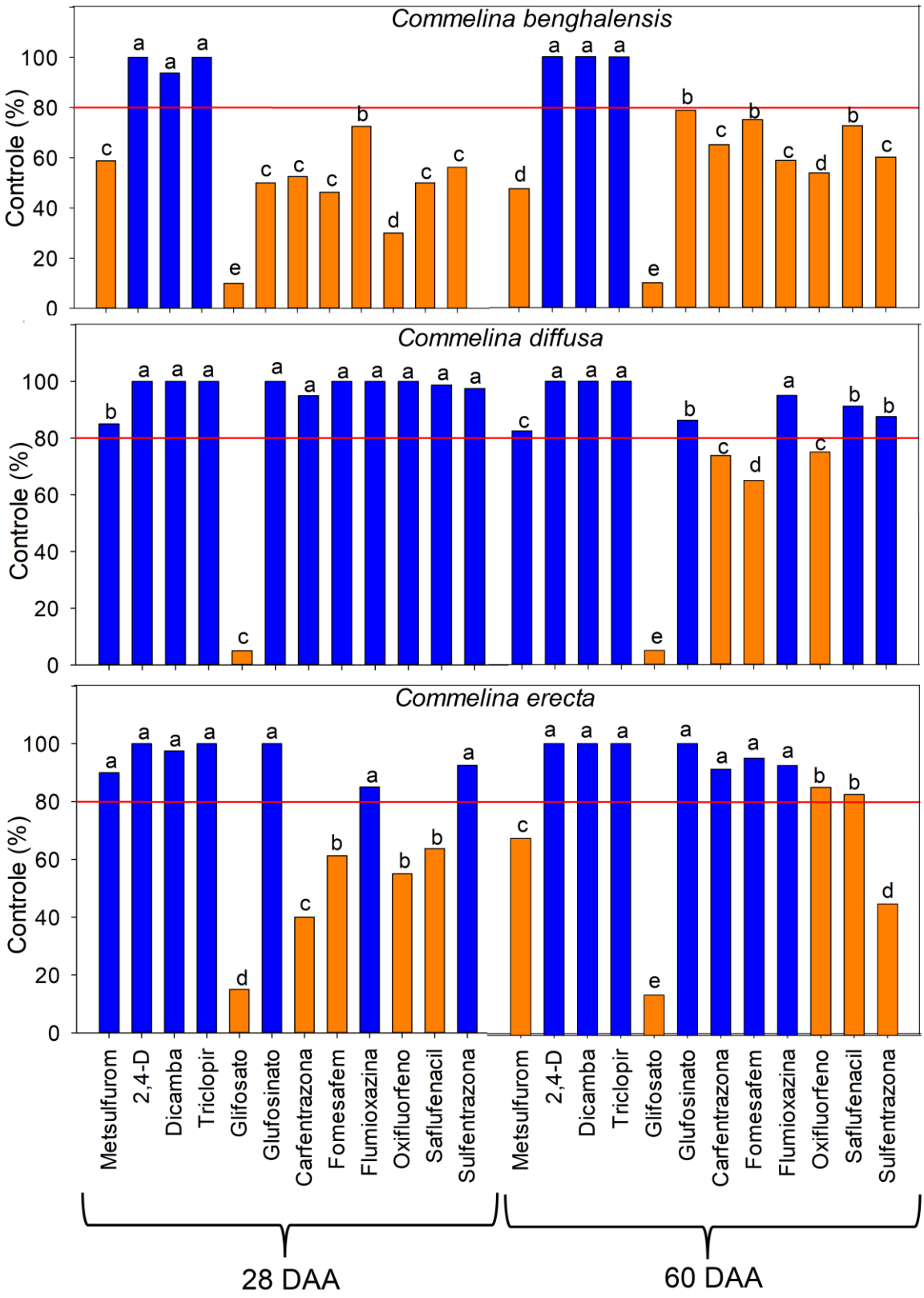

Commelina benghalensis
Commelina diffusa
Commelina erecta
Controle (%)
0
20
40
60
80
100
Metsulfurom
2,4-D
Dicamba
Triclopir
Glifosato
Glufosinato
Carfentrazona
Fomesafem
Flumioxazina
Oxifluorfeno
Saflufenacil
Sulfentrazona
28 DAA
60 DAA

Figura 1.1. Porcentagem de controle de *Commelina benghalensis*, *C. diffusa* e *C. erecta* aos 28 e 60 dias após a aplicação (DAA) de diferentes herbicidas aplicados isoladamente. A linha horizontal indica o valor mínimo considerado como controle satisfatório (80%). Médias seguidas pela mesma letra não se diferem estatisticamente pelo teste de agrupamento de médias Skott Knott ($p \leq 0,05$).

1.3.2 Controle de espécies de *Commelina* spp. com misturas de herbicidas

A maioria das misturas de herbicidas apresentou efeito aditivo ou sinérgico sobre as espécies de *Commelina*, proporcionando níveis de controle semelhantes ou superiores aos observados com os herbicidas aplicados isoladamente. Apenas algumas combinações apresentaram efeito antagônico.

Para *C. benghalensis*, as combinações de herbicidas mimetizadores de auxina com glifosato mantiveram controle satisfatório (superior a 80%) aos 28 e 60 dias após a aplicação (DAA), assim como a mistura 2,4-D + saflufenacil. As demais combinações apresentaram efeitos aditivos ou sinérgicos em relação ao controle esperado. Aos 28 DAA, a maioria das misturas proporcionou controle inferior a 80%, com exceção de carfentrazona + glifosato, que atingiu 84% de controle e apresentou efeito sinérgico (26% acima do esperado). Em contrapartida, a mistura flumioxazina + glifosato apresentou efeito antagônico em ambos os períodos de avaliação, com apenas 58% e 50% de controle, respectivamente, valores 13% inferiores aos esperados. Aos 60 DAA, o controle de *C. benghalensis* aumentou para níveis superiores a 80% nas misturas de glifosato com metsulfurom-metílico, oxifluorfeno e saflufenacil, todas com efeito sinérgico. A combinação com sulfentrazona proporcionou 77% de controle, valor próximo ao limite considerado satisfatório. Por outro lado, as misturas com flumioxazina, fomesafem e glufosinato de amônio apresentaram redução na eficácia de controle de 10%, 18% e 50%, respectivamente, caracterizando interação antagônica (Figura 1.2).

Em *C. diffusa*, todas as misturas apresentaram controle superior a 80% aos 28 DAA. As combinações contendo glufosinato de amônio, metsulfurom-metílico e oxifluorfeno apresentaram efeito sinérgico, enquanto a mistura com flumioxazina apresentou leve efeito antagônico (91%), embora tenha mantido controle satisfatório. Aos 60 DAA, a maioria dos tratamentos manteve controle superior a 80%, com

exceção das misturas contendo flumioxazina (74%) e glufosinato de amônio (68%), que apresentaram efeito antagônico, ambas com controle 19% inferior ao esperado. Apesar do efeito aditivo, a mistura com oxifluorfeno também resultou em controle inferior a 80% (Figura 1.2).

Para *C. erecta*, a maioria das misturas proporcionou controle satisfatório, superior a 80%, tanto aos 28 quanto aos 60 DAA, apresentando predominantemente efeitos aditivos ou sinérgicos. A única mistura que apresentou efeito antagônico foi flumioxazina + glifosato, que também mostrou antagonismo nas outras duas espécies. Na primeira avaliação, essa combinação apresentou controle 53% inferior ao esperado (96%) e, na segunda avaliação, 11% inferior, embora ainda tenha proporcionado controle satisfatório de 82% (Figura 1.2).

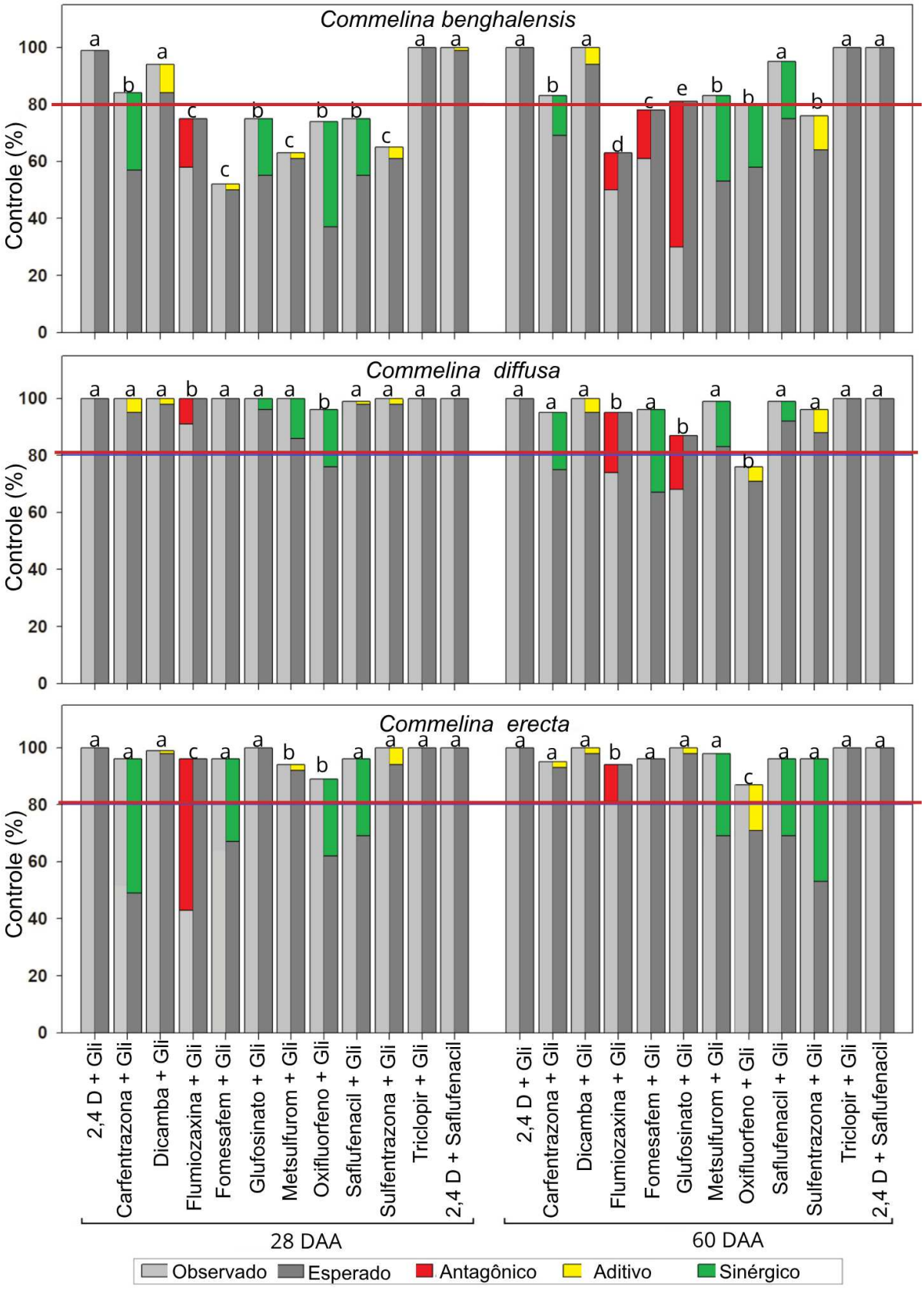


Figura 1.2. Comparação entre o controle observado e o controle esperado de *Commelina benghalensis*, *C. diffusa* e *C. erecta* aos 28 e 60 dias após a aplicação

(DAA) de diferentes misturas de herbicidas, destacando as interações antagônicas, aditivas e sinérgicas. A linha horizontal indica o valor mínimo considerado como controle satisfatório (80%). Os valores observados foram submetidos ao teste de média, e as médias seguidas pela mesma letra não se diferem estatisticamente pelo teste de agrupamento de médias Skott Knott ($p \leq 0,05$).

1.3.3 Redução de biomassa seca de espécies de *Commelina* spp.

Todos os tratamentos reduziram a biomassa da parte aérea das plantas em comparação ao controle. O herbicida com pior desempenho nas três espécies de *Commelina* foi o glifosato, com reduções de biomassa inferiores a 20%.

Em *C. benghalensis*, a redução da biomassa foi, de modo geral, consistente com as avaliações visuais de controle. Os tratamentos mais eficazes foram triclopir (76%), triclopir + glifosato (73%) e 2,4-D + saflufenacil (70%). Por outro lado, as menores reduções de biomassa (entre 8% e 20%) foram observadas nos tratamentos com glufosinato de amônio + glifosato, metsulfurom-metílico e sulfentrazona aplicados isoladamente, refletindo sua baixa eficácia no controle.

Para *C. diffusa*, a redução da biomassa complementou as avaliações visuais de controle, embora tenham sido observadas diferenças entre a injúria visual e a supressão a longo prazo. Entre os tratamentos que proporcionaram mais de 95% de controle em ambas as avaliações, destacaram-se triclopir, carfentrazona + glifosato e saflufenacil + glifosato, com reduções de biomassa superiores a 80%. Em contrapartida, tratamentos com menos de 80% de controle, como carfentrazona, oxifluorfeno, fomesafem, oxifluorfeno + glifosato, flumioxazina + glifosato e glufosinato de amônio + glifosato, apresentaram reduções de biomassa entre 18% e 30% (Figura 1.3).

Para *C. erecta*, os dados de biomassa também refletiram os níveis de controle visual aos 28 e 60 DAA. Os tratamentos que proporcionaram controle superior a 80% também reduziram significativamente a biomassa, como 2,4-D, dicamba, flumioxazina, glufosinato de amônio e todas as misturas, exceto oxifluorfeno + glifosato (74%) e flumioxazina + glifosato (65%). Por outro lado, sulfentrazona (30%) e metsulfurom-metílico (51%) aplicados isoladamente apresentaram as menores reduções de biomassa, acompanhadas de controle visual insatisfatório, indicando baixa eficácia no controle de *C. erecta* (Figura 1.3).

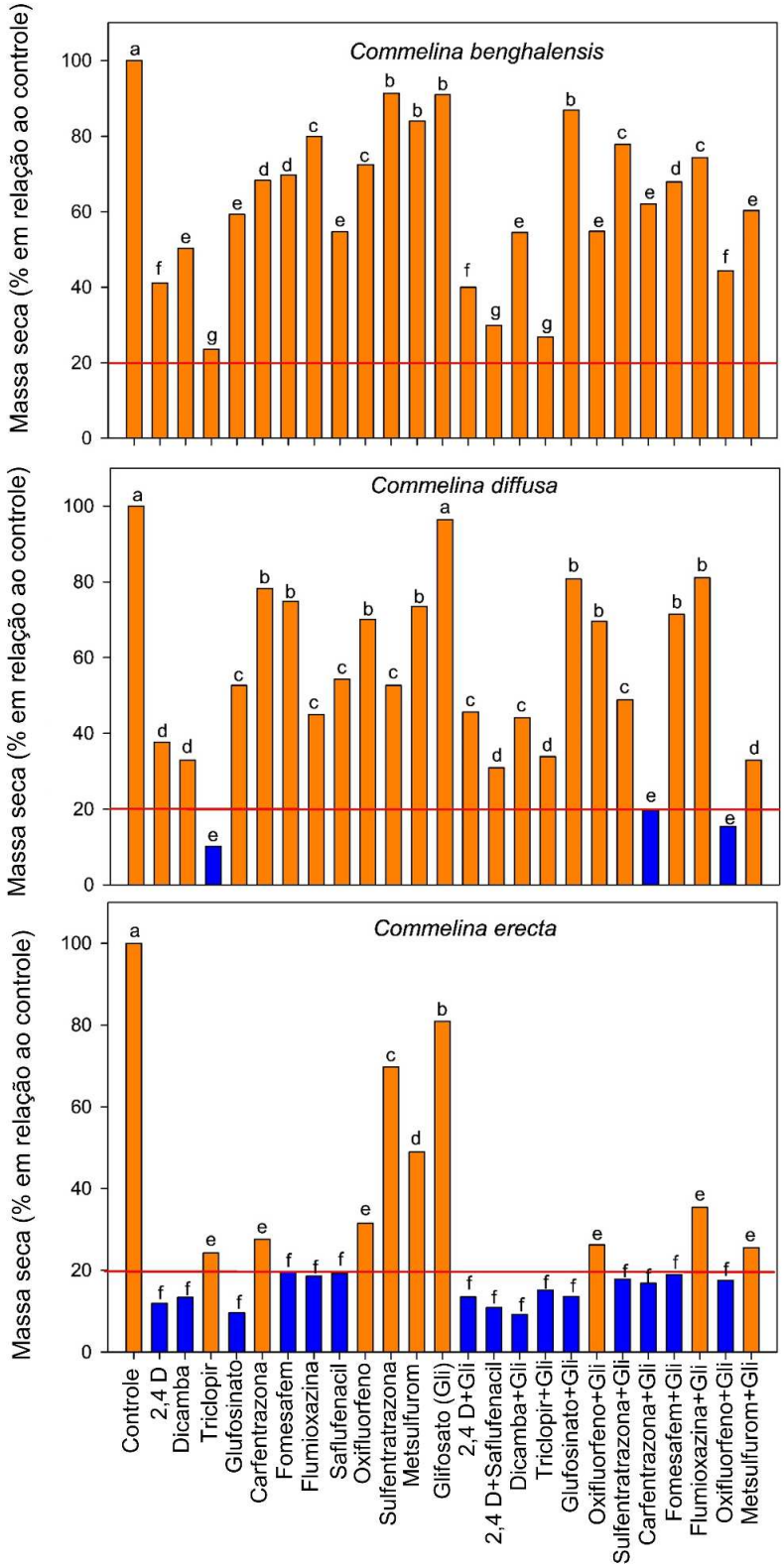


Figura 1.3. Porcentagem de biomassa seca de *Commelina benghalensis, C. diffusa* e *C. erecta* aos 60 dias após a aplicação de diferentes misturas de herbicidas, expressa em relação à biomassa seca das respectivas testemunhas não tratadas.

1.4. Discussão

1.4.1 Controle de espécies de *Commelina* spp. com herbicidas aplicados isoladamente

A eficácia dos herbicidas aplicados isoladamente variou entre as espécies de *Commelina* e os períodos avaliados. Esses resultados são consistentes com estudos anteriores que relataram diferenças na suscetibilidade a herbicidas entre espécies de *Commelina* (Carneiro et al., 2025). O glifosato foi o tratamento menos eficaz, confirmando a elevada tolerância das três espécies a esse herbicida. Em *C. benghalensis*, essa tolerância está associada à reduzida absorção e metabolização do herbicida (Meschede et al., 2020). Por outro lado, *C. diffusa* e *C. erecta* apresentam elevado potencial de rebrota e alta concentração de amido nos caules, o que dificulta a translocação do glifosato (Hamid et al., 2019).

O controle de *C. benghalensis* com herbicidas isolados é dificultado pelo sistema radicular vigoroso e pela capacidade de rebrota (Zambrini et al., 2025). Contudo, os herbicidas auxínicos (2,4 D, dicamba e tricopir) foram eficazes, com triclopir apresentando maior controle, seguido 2,4 D e dicamba. A diferença na eficácia dos herbicidas auxínicos pode ser explicada pelo complexo mecanismo de ação desse grupo, que é multialvo e pode variar entre espécies. Dessa forma, o potencial de controle desses herbicidas é influenciado pela família química e pela estrutura molecular de cada molécula (Larini et al., 2025).

O leve aumento no controle de alguns herbicidas aos 60 DAA sugere que, embora o controle não tenha sido satisfatório, essas moléculas reduziram o potencial de rebrota de *C. benghalensis*, mantendo efeito residual na planta. Por sua vez, a redução na eficácia de controle aos 60 DAA de flumioxazina e metsulfurom-metílico, demostra a limitação desses herbicidas em suprimir a rebrota de *C. benghalensis*, sendo mais efetivo em estágios iniciais de desenvolvimento e não em plantas adultas (Freitas et al., 2018).

A elevada sensibilidade de *C. diffusa* aos herbicidas aplicados isoladamente pode estar relacionada às condições do ambiente de coleta das mudas e à condução do experimento. Em ambientes protegidos e irrigados, a espécie tende a produzir maior número de folhas, aumentando a exposição ao herbicida (Santos et al., 2017). Sob condições de sombreamento, características como maior área foliar, maior

densidade estomática e cutículas mais finas (Taiz & Zeiger, 2015) favorecem o controle químico, possibilitando a redução da dose em até 25%, com obtenção de 81% de controle de espécies de *Commelina* (Santos et al., 2017). Contudo, herbicidas de contato, como carfentrazona, oxifluorfeno e fomesafem (inibidores da PROTOX), causam rápida necrose nas folhas, proporcionando um controle inicial satisfatório (28 DAA). No entanto, por não atingem as estruturas de reserva, esses herbicidas permitem a rebrota, o que explica a redução de controle aos 60 DAA.

Em *C. erecta,* o baixo controle com herbicidas inibidores da PROTOX aos 28 DAA pode estar relacionado ao estágio avançado de desenvolvimento das plantas, que reduz a eficácia desses produtos em pós-emergência tardia. Resultados semelhantes foram observados para esta espécie com herbicidas desse mecanismo de ação, apresentando apenas 20% de controle e sintomas limitados à clorose e necrose das folhas jovens (Vega et al. 2000). Por outro lado, a redução da eficácia de sulfentrazona e metsulfurom aos 60 DAA é atribuída à limitada ação desses herbicidas em *C. erecta*, sobretudo em estágios avançados de desenvolvimento. Embora a sulfentrazona tenha ação residual, sua eficácia é limitada quando aplicado em pós-emergência tardia. Em plantas de 15-25 cm, o controle com sulfentrazona foi de apenas 15% (Rocha et al., 2007). Herbicidas inibidores da ALS, como tifensulfuron-metilíco (similar ao metsulfurom-metílico), apresentaram controle inferior ao glifosato (6% de controle aos 28 DAA) (Vega et al. 2000). Esses resultados demostram a baixa sensibilidade de *C. erecta* a esses herbicidas.

1.4.2 Controle de espécies de *Commelina* spp. com misturas de herbicidas

Os tratamentos 2,4-D + glifosato, triclopir + glifosato e 2,4-D + saflufenacil proporcionaram mais de 90% de controle de *C. benghalensis*. Esses resultados destacam a importância dos herbicidas auxínicos, aplicados isoladamente ou em mistura, para o manejo dessa espécie (Ronchi et al., 2002; Antuniassi et al., 2024; Filus et al., 2024). O efeito aditivo de dicamba e 2,4-D em mistura com glifosato já foi relatado para *C. benghalensis* (Larini et al., 2025). Da mesma forma, um efeito sinérgico da mistura 2,4-D + saflufenacil foi reportado para *Conyza sumatrensis* e atribuído ao aumento da absorção de 2,4-D (Dalazen et al., 2015). Entretanto, no presente estudo, foi observado apenas efeito aditivo para essa mistura.

As misturas carfentrazona-etílica + glifosato e saflufenacil + glifosato apresentaram interações sinérgicas e proporcionaram controle eficaz de *C.*

benghalensis, embora ligeiramente inferior ao obtido com os tratamentos mais eficientes. O saflufenacil apresenta translocação predominantemente via xilema, com mobilidade limitada no floema, diferindo de outros inibidores da PROTOX que apresentam ação essencialmente de contato. Essa característica pode favorecer sua associação com o glifosato, não comprometendo a atividade desse herbicida. Embora alguns herbicidas de contato possam reduzir a translocação de herbicidas sistêmicos (Zaidan et al., 2021), esse efeito não foi observado para a mistura carfentrazona + glifosato, que apresentou interação sinérgica no presente estudo.

Por outro lado, a redução da translocação do glifosato pode resultar em antagonismo em determinadas combinações, como observado para as misturas de flumioxazina, fomesafem e glufosinato de amônio com glifosato. O antagonismo relatado para flumioxazina + glifosato em *Sesbania exaltata* foi atribuído à rápida necrose dos tecidos, que prejudicou a absorção do glifosato (Shaw & Arnold, 2002). Resultado semelhante foi relatado para a mistura glufosinato de amônio + glifosato. Embora tenha ocorrido um efeito sinérgico inicial, a rápida necrose causada pelo glufosinato favoreceu a rebrota das plantas (Bethke et al., 2017). Herbicidas de contato, em geral, têm baixa eficácia no controle de *C. benghalensis* em estágios avançados de desenvolvimento (Freitas et al. 2018), pois a necrose das folhas não impede a rebrota a partir dos tecidos meristemáticos e de reserva (Jerônimo et al., 2021).

Para *C. diffusa*, as misturas de flumioxazina, glufosinato e oxifluorfeno com glifosato apresentaram um desempenho semelhante ao observado em *C. benghalensis.* Embora oxifluorfeno não teve efeito antagônico com glifosato, houve redução ne controle de *C. diffusa*, aos 60 DAA. Para esta espécie, o controle visual não é suficiente para avaliar a eficácia do manejo. *Commelina diffusa* acumula reservas significativas em caule e raiz, o que dificulta a translocação de herbicida e favorece a rebrota posterior tratamento (Freitas et al. 2018), contribuindo para explicar a redução do controle ao longo do tempo.

Com exceção das misturas oxifluorfeno + glifosato aos 60 DAA e flumioxazina + glifosato 28 DAA, todas as misturas foram excelentes no controle de *C. erecta.* Isso corrobora estudos que indicam alta susceptibilidade ao tratamento com herbicidas em plantas dessa espécie de até 30 cm. O glifosato, na dose 360 g. e.a. ha^{-1} controlou 100% das plantas de 6 a 9 cm de *C. erecta*, mas em plantas de 35 a 40 cm, essa

mesma dose não obteve controle satisfatório (Nisensohn e Tuesca 2011). O controle de *C. erecta* diminui à medida que o tamanho da planta aumenta (Papa et al. 2013; Ferreira et al. 2017), especialmente em condições de campo, sendo mais eficaz durante o pousio de outono, quando as plantas ainda estão em crescimento (AAPRESID, 2022).

1.4.3 Redução de biomassa seca de espécies de *Commelina* spp.

O controle visual e a redução da biomassa seca fornecem informações complementares e não necessariamente apresentam correspondência direta, especialmente em espécies com elevada capacidade de propagação vegetativa e rebrota. Enquanto o controle visual reflete a expressão dos sintomas de injúria causados pelos herbicidas, a redução da biomassa fornece uma estimativa mais robusta da supressão do crescimento em longo prazo e do potencial de recuperação das plantas (Fellmann et al., 2024). Portanto, diferenças entre essas variáveis são esperadas quando os tratamentos causam injúrias visuais severas, mas não suprimem completamente a rebrota.

A avaliação conjunta do controle visual e da redução da biomassa seca fornece uma estimativa confiável da eficácia dos tratamentos, especialmente em espécies com elevada capacidade de rebrota. Em *C. diffusa*, embora tenham sido observados altos níveis de controle visual, apenas os tratamentos com triclopir, carfentrazona + glifosato e saflufenacil + glifosato reduziram a biomassa em mais de 80%. Esse resultado demonstra que os sintomas visuais iniciais nem sempre refletem a supressão da planta em longo prazo, reforçando a importância da avaliação da biomassa na determinação da eficácia de herbicidas em espécies com capacidade de rebrota. Em *C. erecta*, apesar do controle visual intermediário observado em alguns tratamentos, a maioria deles promoveu reduções substanciais da biomassa, comprometendo a capacidade de rebrota e dificultando a reinfestação da espécie.

Em *C. benghalensis*, as maiores reduções de biomassa foram obtidas com os herbicidas auxínicos, como triclopir e 2,4-D, reforçando a importância desse mecanismo de ação para o manejo da espécie.

As respostas contrastantes observadas entre *C. benghalensis*, *C. diffusa* e *C. erecta* demonstram que o desempenho dos herbicidas e as interações entre eles são dependentes da espécie. Os herbicidas auxínicos, especialmente triclopir e 2,4-D, proporcionaram o controle mais consistente, enquanto a eficácia dos herbicidas de

contato foi frequentemente limitada pela capacidade de rebrota das plantas. Esses resultados evidenciam as limitações da extrapolação de recomendações de manejo de uma espécie de *Commelina* para outra e reforçam a importância de avaliações específicas para cada espécie.

1.5 Conclusão

A eficácia dos herbicidas aplicados isoladamente e em mistura variou entre as espécies de *Commelina*. Entre os herbicidas aplicados isoladamente, os herbicidas auxínicos, especialmente triclopir e 2,4-D, proporcionaram o controle mais consistente, particularmente para *C. benghalensis*. As misturas de herbicidas resultaram em interações aditivas, sinérgicas ou antagônicas, dependendo da espécie, demonstrando que o desempenho dos tratamentos não pode ser generalizado para todas as espécies de *Commelina*. As misturas 2,4-D + glifosato, triclopir + glifosato e 2,4-D + saflufenacil estiveram entre os tratamentos mais eficazes avaliados e representam alternativas viáveis para situações em que o glifosato aplicado isoladamente proporciona controle inadequado.

1.6 Referências bibliográficas

Aapresid: Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa. 2022., Disponível em: https://www.aapresid.org.ar/blog/commelina-erecta-santa-no-santa, acesso em 15 de março de 2025.

Abbas, T.; Nadeem, M. A.; Tanveer, A.; Ahmad, R. Identifying optimum herbicide mixtures to manage and avoid fenoxaprop-p-ethyl resistant *Phalaris minor* in wheat. **Planta Daninha**, v. 34, p. 787-794, 2016. https://doi.org/10.1590/S010083582016340400019.

Agostineto, M. C.; Carvalho, L. D.; Ansolin, H. H.; Andrade, T. D.; Schmit, R. Synergism of mixtures of glyphosate and PROTOX inhibitor herbicides for morning-glory control. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 15, p. 8–15, 2016. https://doi.org/10.5965/223811711512016008.

Antuniassi, U. R.; Carbonari, C. A.; Mota, A. A.; Checheto, R. G.; Carvalho, F. K.; Ovejero, R. F. L.; Pai, N. Dicamba volatility assessment in a tropical environment. **Advances in Weed Science**, v. 42, p. e020240062, 2024. 10.51694/AdvWeedSci/2024;42:00026.

Bethke, R. K.; Molin W. T.; Sprague C.; Penner D. Evaluation of the interaction between glyphosate and glufosinate. **Weed Science**, v. 61, p. 41-47, 2017. https://doi.org/10.1614/WS-D-12-00031.1.

Castro, L. M. F.; Cunha, P. C. R.; Pereira, W. J.; Gonçalves, D. J.; Siqueira, A. P. S. Efeito de doses de glifosato e de misturas de herbicidas no controle de vassourinha-de-botão em pré-semeadura da cultura da soja. **Revista Agronomia Brasileira**, v. 5, p. 1-13, 2021.

Colby, S. R. Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations. **Weeds**, v. 15, p. 20-22, 1967. https://doi.org/10.2307/4041058.

Costa, A. G. F.; Bacha, A. L.; Pires, R. N.; Pavani, M. D.; Alves, P. A. Interferência de *Commelina benghalensis* no crescimento inicial de *Eucalyptus grandis* no inverno e no verão. **Ciência Florestal**, v. 31, p. 590-606, 2021. https://doi.org/10.5902/1980509825556.

Daba, A.; Tadesse, M.; Negassa, S; Berecha, G. Weed species composition and abundance in the main coffee production systems and regions of Ethiopia. **South African Journal of Plant and Soil**, v. 39, p. 41-55, 2022. https://doi.org/10.1080/02571862.2021.1987536.

Dalazen, G.; Kruse, N. D.; Machado, S. L. D. O. Herbicides with potential use in the control of hairy fleabane and their selectivity in oats and ryegrass. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, p. 792-799, 2015. https://doi.org/10.5935/1806-6690.20150067.

Damião, V.; Barroso, A. A. M.; Alves, P. L. D. C.; Lemos, L. B. Consorciação de milho e culturas de sucessão altera a comunidade de plantas daninhas em feijão comum sob plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 50, p. e65244, 2021. https://doi.org/10.1590/1983-40632020v5065244.

Ferreira, E. B; Cavalcanti, P. P.; Nogueira D. A. (2014) ExpDes: An R Package for ANOVA and Experimental Designs. AM 05:2952–2958. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.

Ferreira, S. D.; Salvalaggio, A. C.; Moratelli, G., Vasconcelos, E. D.; Costa, N. V. *Commelina* species control with desiccants alone and in mixtures. **Planta Daninha**, v. 35, p. e017165664, 2017. https://doi.org/10.1590/S0100-83582017350100074.

Filus, A.; Barroso, A. A. M.; Albrecht, A. J. P.; Silva, A. F. M.; Albrecht, L. P.; Roncatto, E. Application technology and effectiveness of auxin herbicides in controlling *Conyza sumatrensis* and *Commelina benghalensis*. **Revista de agricultura neotropical**, v. 11, p. e8319-e8319, 2024. https://doi.org/10.32404/rean.v11i1.8319.

Freitas, N.; Freitas, F.; Furtado, I.; Teixeira, M.; Silva, V. Misturas de Herbicidas para o Controle da Trapoeraba e o Efeito da Deriva na Cultura do Café. **Planta Daninha**, v. 36, p. e018169798, 2018. https://doi.org/10.1590/S0100-83582018360100047.

Hamid, A.; El Bous, M. The Invasive Species *Commelina benghalensis* L.: A Step Towards the Biological Flora of Egypt. **Catrina: The International Journal of Environmental Sciences**, v. 18, p. 7-23, 2019. 10.21608/cat.2019.28585.

Irakiza, R.; Darius, A.; Arnold, W.; Samuel, M.; Paul, M.; Paul, K. Environmental and management factors that influence *Commelina* species in selected agro-ecological zones in Western Kenya. **American Journal of Plant Sciences**, v. 13, p. 884-911, 2022. 10.4236/ajps.2022.136059.

Isaac, W. A.; Gao, Z.; Li, M. **Managing Commelina species: Prospects and limitations**. 1 ed. London: IntechOpen, 2013.

Larini, W. F.; Albrecht, A. J. P.; Neuberger, D. C.; Barroso, A. A.; Albrecht, L. P. Interaction of glyphosate with auxin herbicides for control of Benghal dayflower (*Commelina benghalensis*) at advanced growth stages. **Weed Technology**, v. 39, p. e56, 2025. https://doi.org/10.1017/wet.2025.23.

Maciel, C. D.; Vargas, B. B.; Helvig, E. O.; Matias, J. P.; de Resende, J. T. V.; Lustosa, S. B. C. Influence of tank mixtures herbicides in pre-emergence of the chia crop. **Research, Society and Development**, v. 9, p. e72973669-e72973669, 2020. https://doi.org/10.33448/rsd-v9i7.3669.

Meschede, D. K.; da Silva, F. E.; Fernandes, D.; Olveira, E. C.; Anunciato, V. M. Absorption and translocation tolerance of glyphosate. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, p. 4738-4747, 2020. https://doi.org/10.5897/AJAR2015.10370.

Nampy, S. Flowering phenology, floral biology, breeding system, and pollination in the andromonoecious *Commelina diffusa* (Commelinaceae). **Botany**, v. 101, p. 1-25, 2023. https://doi.org/10.1139/cjb-2022-0114.

Nisensohn, L.; Tuesca, D.; Faccini, D.; Puricelli, E.; Vitta, J. Biological factors determining *Commelina erecta* competition with other weeds in cultivated systems. **Planta Daninha**, v. 29, p. 97-106, 2011. https://doi.org/10.1590/S0100-83582011000100012.

Papa, J. C.; Tuesca, D. Los problemas actuales de malezas en la región sojera núcleo argentino: origen y alternativas de manejo. In: Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa. *Viabilidad del glyphosate en sistemas productivos sustentables*. Rosario: Aapresid, 2013. p. 59–74.

R Core Team. *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2019. Disponível em: https://www.r-project.org/.

Renton, M.; Willse, A.; Aradhya, C.; Tyre, A.; Head, G. Simulated herbicide mixtures delay both specialist monogenic and generalist polygenic resistance evolution in weeds. **Pest Management Science**, v. 80, p. 5983-5994, 2024. https://doi.org/10.1002/ps.8331.

Rocha, D. C.; Rodella, R. A.; Martins, D.; & Maciel, C. D. D. G. Efeito de herbicidas sobre quatro espécies de trapoeraba. **Planta Daninha**, v. 25, p. 359-364, 2007. https://doi.org/10.1590/S0100-83582007000200016.

Rocha, R. A. D. S.; Santos, D. D. A. T.; Búfalo, V. C. F.; Soares, K. R.; Couto, G. R. Synergism between herbicides in the control of the viola rope (*Ipomoea Grandifolia*) in post-emergence. **Research, Society and Development**, v. 10, p. e215101220429, 2021. 10.33448/rsd-v10i12.20429.

SANTOS JÚNIOR, Antônio dos. **Herbicidas com potencial para o manejo de plantas daninhas em eucalipto**. 2017. 53 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) –

Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

Santos, I. C.; Ferreira, F. A.; Silva, A. A.; Miranda, G. V.; Santos, L. D. T. Eficiência do 2,4-D aplicado isoladamente e em mistura com glifosato no controle da trapoeraba. **Planta Daninha**, v. 20, p. 299-309, 2002. https://doi.org/10.1590/S0100-83582002000200017.

Shaw, D. R.; Arnold, J. C. Weed control from herbicide combinations with glyphosate. **Weed Technology**, v. 16, p. 1-6, 2002. https://doi.org/10.1614/0890-037X(2002)016[0001:WCFHCW]2.0.CO;2.

Soares, D. O. P.; Albertino, S. M. F.; Souza, F. C. P.; Santos, A. F.; Silva, J. F. Period of weed interference in guarana crop. **Planta Daninha**, v. 37, p. e019192377, 2019. https://doi.org/10.1590/S0100-83582019370100070.

Taiz, L.; Zeiger, E.; Møller, I. M.; Murphy, A. **Plant Physiology and Development.** 6ª ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2015, p. 761.

Teixeira, P. C.; Donagema, G. K.; Fontana, A.; Teixeira, W. G. **Manual de métodos de análise do solo**. 3ª ed. Brasília*:* Editora Embrapa, 2017, p. 500-573.

Trezzi, M. M.; Vidal, R. A.; Patel, F.; Miotto, E.; Debastiani, F.; Balbinot, A. A.; Mosquen, R. Impact of *Commelina benghalensis* density and establishment period on soyabean grain yield, yield components and economic threshold. **Weed Research**, v. 55, p. 34-41, 2015. 10.1111/wre.12125.

Vanhala, P.; Kurstjens, D.; Ascard, J.; Bertram, A.; Cloutier, D. C.; Mead, A.; Raffaelli, M.; Rasmussen, J. Guidelines for physical weed control research: Flame weeding, weed harrowing and intra-row cultivation. In Proceedings of the 6th EWRS—Workshop on Physical and Cultural Weed Control, Lillehammer, Norway, 8–10 March 2004; pp. 208–239.

Vega, M. H.; Lemir, A. H.; García, A. E.; Pace, R.; Aceñolaza, M. Control de *Commelina erecta* L. con herbicidas postemergentes con el objetivo de su uso en cultivos de soja transgénica. **Planta Daninha**, v. 18, p. 51-56, 2000. https://doi.org/10.1590/S0100-83582000000100005.

Vicensi, T.; Albrecht, L.; Albrecht, A.; Silva, A.; Backes, M.; Mundt, T. T. Mixtures of Herbicides and Time of Application to Control *Commelina Benghalensis* in Maize and Off-Season**. Outlooks on Pest Management**, v. 35, p. 81-88, 2024. https://doi.org/10.1564/v35_apr_08.

Zaidan, Ú. R.; Motta, L. M.; de Souza, W. M.; Faria, R. M.; Paiva, M. C., Mendes, K. F.; de Freitas, F. C. L. Multi-mixture herbicides provide management strategies in the control of the aquatic weed *Heteranthera reniformis*. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 24, p. 137-144, 2021. https://doi.org/10.1007/s12892-020-00065-2.

Zambrini, C. I.; Albrecht, A. J. P.; Albrecht, L. P.; Migliavacca, R. A.; Silva, A. F. M.; Zobiole, L. H. S. Eficácia do florpirauxifeno-benzil e outros herbicidas no controle de *Commelina benghalensis*. **Revista Ceres**, v. 72, p. e72012, 2025. https://doi.org/10.71252/2177-34912025720012.

CAPÍTULO 2

GLIFOSATO ALTERA OS TEORES DE ÁCIDO CHIQUÍMICO E DE COMPOSTOS FENÓLICOS E A ANATOMIA FOLIAR EM ESPÉCIES TOLERANTES DE *Commelina*

RESUMO: *Commelina benghalensis* e *C. diffusa* apresentam tolerância ao glifosato, dificultando o manejo dessas plantas daninhas. Este estudo avaliou os efeitos do herbicida (1000 g equivalente ácido (e.a. ha^{-1}) sobre o acúmulo de ácido chiquímico, compostos fenólicos totais e alterações anatômicas. O ácido chiquímico foi quantificado por HPLC aos 1, 3, 7, 10 e 12 dias após a aplicação (DAA). Os compostos fenólicos foram avaliados pelo método Folin-Ciocalteu e as alterações anatômicas por microscopia de luz e eletrônica de varredura aos 12 DAA. *Commelina benghalensis* acumulou 32% a mais de ácido chiquímico 1 DAA em relação ao controle, enquanto *C. diffusa* apresentou aumento apenas 3 DAA (71,5%). Em folhas expandidas, ambas as espécies exibiram clorose, necrose, redução de crescimento, divisões anormais nas células epidérmicas, deformação nos estômatos, redução de cutícula, hiperplasia no mesofilo e danos nos feixes vasculares. O glifosato não alterou o teor de compostos fenólicos nas folhas jovens de *C. benghalensis*, enquanto em *C. diffusa* a redução foi de 15,6% em relação ao controle. Nas folhas expandidas, os níveis diminuíram 23,9% em *C. benghalensis* e 20,6% em *C. diffusa.* Embora as alterações anatômicas tenham sido semelhantes entre as espécies, os padrões de acúmulo de ácido chiquímico e as alterações nos compostos fenólicos diferiram após a aplicação do glifosato. Esses resultados demonstram que a exposição ao herbicida desencadeia respostas bioquímicas associadas a modificações estruturais em espécies de *Commelina*.

Palavras-chave: Microscopia eletrônica, metabolismo secundário, via do ácido chiquímico, tolerância a herbicida

2.1 Introdução

O gênero *Commelina* inclui aproximadamente 170 a 215 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Hajiboland et al., 2024). *Commelina benghalensis* e *C. diffusa* se destacam como plantas daninhas por sua ampla adaptação a diferentes ambientes e alta eficiência reprodutiva. Essas espécies são tolerantes ao glifosato, herbicida mais usado no mundo por seu amplo espectro, o que dificulta seu manejo e aumenta os custos de produção (Larini et al., 2025).

O glifosato bloqueia a EPSPs (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato síntase), componente essencial na via do ácido chiquímico. Essa via sintetiza aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano (Almeida et al., 2024). A fenilalanina e a tirosina estão envolvidos na via fenilpropanoide, que produz metabólitos secundários como compostos fenólicos, flavonóides e lignina. Esses compostos desempenham papéis antioxidantes, estruturais e de defesa vegetal (Khan et al., 2025). O triptofano é um precursor da biossíntese de ácido indol-3-acético (AIA) e de alcaloides indólicos, importantes no crescimento e defesa (Casanova-Sáez et al., 2021). Portanto, ao inibir a EPSPS, além de restringir a formação direta de aminoácidos aromáticos, a ação do glifosato também compromete rotas metabólicas secundárias, afetando a síntese de hormônios, compostos estruturais e moléculas de defesa fundamentais para a sobrevivência e adaptação das plantas (Almeida et al., 2023).

Espécies de plantas sensíveis ao glifosato acumulam ácido chiquímico e apresentam redução na síntese de compostos derivados dessa via (Martinelli et al., 2022). Em contraste, espécies tolerantes conseguem limitar o acúmulo de ácido chiquímico ou manter a produção de metabólitos essenciais por vias alternativas. Por exemplo, *Codonopsis lanceolata* aumenta os teores de fenólicos totais e flavonóides em resposta adaptativa ao herbicida (Ghimire et al., 2017). Já biótipos resistentes de plantas daninhas, como *Amaranthus palmeri,* também compensam os efeitos do glifosato, mas por meio do redirecionamento do metabolismo secundário para o acúmulo de compostos fenólicos (Sandhu et al., 2023).

Estudos anatômicos têm contribuído para identificar os efeitos do glifosato sobre a epiderme, os estômatos, os tecidos vasculares e a deposição de lignina, evidenciando o comprometimento da integridade celular e da fotossíntese (Cruz et al., 2021). No entanto, esses parâmetros ainda não foram elucidados nas espécies do gênero *Commelina*. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar o acúmulo

de ácido chiquímico, as alterações nos teores de fenólicos totais e os danos anatômicos em *C. benghalensis* e *C. diffusa* após a aplicação do glifosato, buscando ampliar o conhecimento sobre os efeitos bioquímicos e estruturais do herbicida nessas espécies.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Obtenção de mudas e Condições de crescimento das plantas

Dois experimentos em casa de vegetação foram conduzidos para avaliar a resposta ao glifosato de *C. benghalensis* e *C. diffusa*. As mudas foram coletadas na Universidade Federal de Viçosa-MG (20°46'06.2" S, 42°52'12.2" W), em área com histórico de aplicação de glifosato. A propagação das mudas ocorreu a partir de partes vegetativas (segmento de caule contendo um par de folhas). Cada unidade experimental foi constituída por vaso de 3,5 L preenchidos com solo e contendo uma muda da respectiva espécie. Os vasos foram irrigados duas vezes ao dia para manter a umidade do solo próxima a capacidade de campo. Aos 30 e 70 dias após o transplante (DAT), a adubação de cobertura foi realizada fornecendo 3,5 g do fertilizante N-P-K (20-05-20) por vaso. As características físico-químicas do solo utilizado são representadas na tabela abaixo (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Característica físico-química do Latossolo:

Atributos químicos									
Solo	MO	pH	P	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Al^{3+}	H+Al	CTC
	%	(H_2O)	--mg dm^{-3}-		----------$cmol_c$ dm^{-3}----------				
Latossolo	2,3	6,5	2,1	160	3,33	0,68	0,0	1,65	6,0

Atributos físicos				
Solo	Argila	Silte	Areia	Textura
	----------%		----------	
Latossolo	49	13	38	Franco-argilosa

MO: Matéria Orgânica, pH: Potencial hidrogeniônico, CTC: Capacidade de troca de Cátions, Fonte: Laboratório de Análise de Solos da Universidade Federal de Viçosa, segundo a metodologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (Teixeira, 2017).

2.2.2 Aplicação de glifosato

Foram utilizadas 64 plantas, com 35-40 cm de altura, de cada espécie, sendo que o glifosato (1000 g de equivalente ácido (e.a.) ha^{-1}) foi aplicado em 44 plantas e 20 permaneceram como controle (sem aplicação). A dose aplicada foi definida com base na dose capaz de causar 80% de injúria (C_{80}) nas plantas, determinada em estudos prévios de curva de dose-resposta.

O glifosato (Roundup UltraMAX, sal de isopropilamina do glifosato, 360 g a.e./L, Monsanto) foi aplicado com um pulverizador costal pressurizado por CO_2 a 300 kPa, equipado com barra de duas pontas modelo TT 11002, espaçadas em 50 cm, calibrado para entregar 180 L ha^{-1} de calda. A aplicação foi realiza a 50 cm do alvo, sob condições ambientais de 80% de umidade relativa, 27 °C e tempo nublado.

As 64 plantas de cada espécie foram distribuídas conforme os ensaios realizados: 12 plantas para análises anatômicas (6 tratadas e 6 controles), 16 plantas para análises de compostos fenólicos (8 plantas tratadas e 8 controles) e 36 plantas para quantificação de ácido chiquímico.

2.2.3 Definição da C_{80} e GR_{80} baseada em curva dose-resposta

Plantas de cada espécie, com 35-40 cm de altura, foram tratadas com diferentes concentrações de glifosato (0; 22,5; 40; 90; 180; 360; 720; 1440; 2880 e 5760 g e.a. ha^{-1}), sendo quatro plantas por repetição por dose. Aos 12 DAA, foram avaliados visualmente os danos e determinada a massa seca da parte aérea, considerando 0% como ausência de sintomas e 100% morte total da planta. A massa seca foi obtida após secagem em estufa a 65 °C até peso constante e pesagem em balança analítica.

As doses do herbicida que proporcionaram 80% de controle visual (C_{80}) e 80% de redução da massa seca (GR_{80}) das espécies foram estimadas a partir do ajuste de curvas log-logísticas inversas, utilizando a equação (Carvalho et al., 2005):

$$x = e * (\frac{d}{y} - 1)^{\frac{1}{b}} \quad (1)$$

Em que y representa o percentual de efeito, x é a dose do herbicida, *d* = 100 é o limite superior da curva e *b* e *e* são os parâmetros ajustados. A menor C_{80} estimada foi adotada como dose padrão para aplicação em ambas as espécies. O ajuste das

curvas e a determinação da C_{80} e GR_{80} foram realizadas em software R (versão 4.1.0). O coeficiente de determinação (R^2) foi utilizado para avaliar a qualidade do ajuste.

2.2.4 Coleta e processamento de amostras para análise anatômica e histoquímica

Folhas jovens foram coletadas para o estudo de ácido chiquímico 1, 3, 7,10 e 12 DAA do glifosato, incluindo amostras do controle 12 DAA. O material foi seco em estufa a 80°C por 15 h e, posteriormente, moído no Tissuelyser II (QIAGEN®, Hilden, Germany) até obtenção de pó homogêneo.

Nos estudos de compostos fenólicos totais, as folhas foram coletadas 12 DAA e separadas em apicais e totalmente expandidas, considerando plantas controle e tratadas. As amostras foram secas em estufa a 40 ºC por 48 h.

Os tecidos foliares para análises anatômicas foram coletados 12 DAA, pela manhã, separando folhas apicais e totalmente expandidas. Vinte e quatro amostras foram obtidas por espécie, correspondente a seis indivíduos para cada tipo de folha e tratamento. Fragmentos da região mediana da lâmina foliar foram fixados em FAA 50% (Formaldeído: ácido acético:etanol 50%, 1:1:18 v/v), por 48 h sob vácuo, e armazenados em etanol 70% até o processamento anatômico (Johansen, 1940).

As amostras estocadas em etanol 70% foram utilizadas para análises anatômicas e histoquímicas. O material foi desidratado em série etilica crescente (70-95%), pré-infiltrado em álcool 95%: 2-hidroxietilmetacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha) 1:1, e infiltrado em Historesina pura por 15 dias, antes do emblocamento. Secções transversais de 5-8 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo automático (RM2265, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA). Os cortes foram corados com Azul de Toluidina (pH 4,7) (O'Brien et al., 1964) e montados em Permount (Fisher Scientifical Mounting Medium). Para detecção de compostos fenólicos, amostras de folhas jovens e expandidas, de seis indivíduos por espécie, foram fixadas em Formalina com Sulfato Ferroso (FSF) por 48h. O controle foi realizado em folhas submetidas a extração dos fenólicos com metanol por 48h e posteriormente transferidas para FSF. Para detecção de flavonóides, utilizou-se Acetato de Chumbo sob fluorescência (Charriere-Ladreis,1976). Os testes histoquíomicos foram feitos em cortes obtidos no micrótomo de mesa.

As imagens foram obtidas em microscópio de luz (Olympus® AX70TRF) com sistema U-Photo e câmera digital acoplada (Zeiss HRC). A fluorescência empregou lâmpada de vapor de mercúrio HBO50 W e um filtro UV.

2.2.5 Extração de ácido chiquímico

A extração seguiu adaptações de metodologia descrita por Matallo et al. (2009). Em cada tubo Falcon foram adicionados 100 mg da amostra foliar seca e 10 mL de água acidificada (pH 2, ajustado com H_3PO_4). As amostras foram agitadas a 80 rpm, por 30 min em agitador vertical e, em seguida, submetidas a aquecimento em forno micro-ondas por 10 s a 100 W. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante (1,5 mL) foi coletado e filtrado em filtros de seringa com membrana de PTFE hidrofílico (25 mm de diâmetro e 0,4 µm de porosidade). As amostras filtradas seguiram para análise em HPLC.

2.2.6 Métodos de determinação por HPLC

2.2.6.1 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) (Shimadzu LC 20 AT, Shimadzu, Tokyo, Japão), equipado com bomba LC20AT e detector UV-Vis SPD- M20A. A coluna utilizada foi C18, VP-ODS de 150 mm a 35°C. A fase móvel consistiu em acetonitrila: ácido fosfórico a 0,01% (v/v) na proporção 95:5, com fluxo 0,5 mL min^{-1}. O ácido chiquímico foi quantificado a 226 nm, utilizando um detector de arranjo fotodiodo, com tempo total de corrida foi 5 min e tempos de retenção variando entre 3,411 e 3,929 min.

2.2.6.2 Validação do método cromatográfico para detecção e quantificação de ácido chiquímico

A validação do método considerou seletividade, linearidade, precisão, exatidão e resolução analítica (INMETRO, 2020). Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) não foram avaliados por ausência de amostras isentas de ácido

chiquímico. O efeito matriz não ocorreu entre espécies, permitindo aplicar a mesma validação do método.

2.2.6.3 Seletividade

A análise da seletividade foi avaliada comparando cromatogramas dos extratos vegetais com e sem a adição de padrão (290 mg L^{-1} de ácido chiquímico).

2.2.6.4 Resolução analítica

A resolução analítica (RA) foi calculada como (ICH, 2005):

$$RA: \frac{3 \times desvio\ padrão\ da\ área}{inclinação\ da\ curva} \quad (2)$$

2.2.6.5 Linearidade

A linearidade foi avaliada por regressão linear, usando soluções de ácido chiquímico em diferentes concentrações (230, 250, 270, 290, 310, 330, 350 mg/L) adicionadas aos extratos das amostras. A linearidade foi determinada pelo coeficiente de determinação do modelo e gráfico de resíduos.

2.2.6.6. Exatidão

A exatidão foi avaliada pela recuperação percentual em três níveis de concentração de ácido chiquímico: 230 mg L^{-1} (baixa), 290 mg L^{-1} (média) e 350 mg L^{-1} (alta), em triplicata. A concentração estimada teve por base a curva analítica, e a porcentagem de recuperação foi calculada por meio da fórmula:

$$RECUPERAÇÃO = \left(\frac{Concentração\ estimada}{Concentração\ real}\right) x100 \quad (3)$$

2.2.6.7. Precisão

A precisão incluiu repetibilidade e precisão intermediária:

Repetibilidade: Desvio padrão relativo (DRP%) deve ser inferior a 5,3% para três concentrações (230, 290, 350 mg L^{-1} ácido chiquímico) do analito em seis replicatas, analisadas no mesmo dia.

Precisão intermediária: As mesmas concentrações do analito, em triplicata, foram avaliadas em três dias distintos. ANOVA foi utilizada para verificar diferenças significativas entre dias.

2.2.7 Análise comparativa de compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram avaliados pelo método de Folin-Ciocalteu adaptado para microplacas (Singleton e Rossi 1965; Sari et al., 2023). Para extração, 50 mg de material vegetal seco foram colocados em Tubo Falcon de 50 mL, adicionados 5 mL de etanol 70% (v/v) e submetidos a ultrassom por 30 min à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi filtrado em filtro PTFE hidrofílico (25 mm, 0,4 µm).

Na quantificação relativa, 20 µL do extrato vegetal (sobrenadante) foram misturados com 90 µL de reagente Folin-Ciocalteu (1:10 em água destilada) e 90 µL de Na_2CO_3 (6% p/v, Merck Chemicals) em microplaca. O branco da reação continha 20 µL de etanol 70% em lugar do extrato vegetal. Após incubação à temperatura ambiente por 90 min, a absorbância foi registrada a 760 nm.

Os resultados foram expressos como valores relativos de absorbância, considerando a média das amostras controle como 100%. Os demais tratamentos calculados conforme:

$$Fenólicos\ totais\ relativos(\%) = \frac{A_{trat} - A_{branco}}{A_{controle} - A_{branco}}\ x100\ (4)$$

Em que A_{trat}: Média da absorbância da amostra tratada com glifosato, A_{branco}: Média da absorbância do branco e $A_{controle}$: Média da absorbância da amostra controle (Sem glifosato). Folhas jovens e completamente expandidas foram analisadas separadamente.

2.2.8 Microscopia eletrônica de varredura

Amostras de folhas jovens e expandidas, de seis indivíduos de cada espécie, fixadas em FAA_{50} e estocadas em etanol 70%, foram desidratadas em série etílica crescente e secas em ponto crítico (Critical Point Dryer, Modelo CPD 030, Balzers, Liechtenstein). O material foi afixado em suporte, metalizado em ouro (Q150RS) e analisado em Microscópio Eletrônico de Varredura (Jeol JSM-IT700HR).

2.2.9 Análise estatística

Os dados da concentração de ácido chiquímico foram submetidos à ANOVA e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$) no software R via R Studio (R Core Team, 2019). Os teores de compostos fenólicos foram comparados com os controles por ANOVA, considerando separadamente folhas jovens e expandidas.

2.3 Resultados

2.3.1 Curva-dose resposta de *C. diffusa* e *C. benghalensis* ao glifosato

As injúrias causadas pelo glifosato aumentaram com o aumento das doses, e a massa seca da parte aérea diminuiu proporcionalmente (Figura 2.1.) O modelo log-logístico ajustou-se bem aos dados de *Commelina benghalensis* e *C. diffusa* ($R^2 \geq 0,98$. A C_{80} estimada foi 1468 g a.i. ha^{-1} para *C. benghalensis* e 1000 g a.i. ha^{-1} para *C. diffusa*, enquanto os valores de GR_{80} foram 1470 e 1007 g a.i. ha^{-1}, respectivamente (Tabela 2.2.).

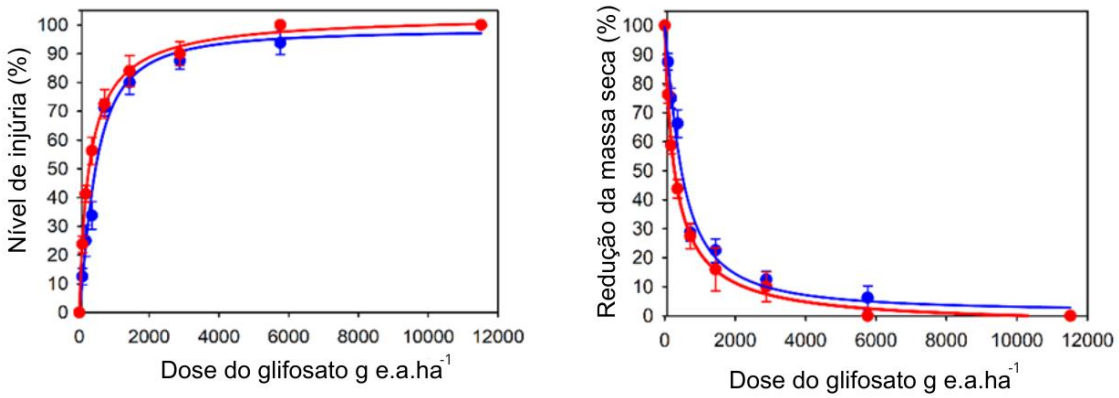


Figura 2.1. Curva dose-resposta de *C. diffusa* (vermelho) e *C. benghalensis* (azul) ao glifosato, com avaliação visual das injúrias C_{80} e redução da massa seca (GR_{80}) ao 12 DAA de glifosato.

Tabela 2.2. Parâmetros estimados do modelo log-logístico para o controle (C_{80}) e a redução de biomassa (GR_{80}) de *Commelina benghalensis* e *Commelina diffusa* em resposta ao aumento das doses de glifosato.

Espécie	**Equação ajustada[1]**	**R^2 (C_{80} /GR_{80})**	**C_{80} / GR_{80} (g e.a. ha^{-1})**
Commelina benghalensis	Controle (C_{80}): $\hat{y} = 0 + (100 - 0) / [1 + (x/476{,}2)^{-1{,}23}]$ Redução da massa seca (GR_{80}): $\hat{y} = 0 + (100 - 0) / [1 + (x/470{,}35)^{1{,}28}]$	0,98 / 0,99	1468 / 1470
Commelina diffusa	Controle (C_{80}): $\hat{y} = 0 + (100 - 0) / [1 + (x/272{,}6)^{-1{,}03}]$ Redução da massa seca (GR_{80}): $\hat{y} = 0 + (100 - 0) / [1 + (x/297{,}15)^{0{,}93}]$	0,99 / 0,99	1000 / 1007

[1]C_{80} e GR_{80} foram estimados a partir do modelo log-logístico ajustado.

2.3.2 Validação do método de HPLC para ácido chiquímico

O método foi confirmado quanto à seletividade pela identificação do pico de ácido chiquímico, sem a interferência de outros compostos na matriz vegetal. O tempo total de corrida foi de 5 min, e o tempo de retenção variou entre 3,411 e 3,929 min (Figura 2.2.A). A resolução analítica foi de 13,4 mg L^{-1}, com diferença de 20 mg L^{-1} entre as

concentrações. O método mostrou alta sensibilidade para detectar pequenas variações na concentração de ácido chiquímico, com resíduos distribuídos aleatoriamente e relação linear entre a área do pico e a concentração do analito (R^2=0,9912) (Figura 2.2.B). A recuperação variou entre 97 e 101%, dentro dos limites aceitáveis (INMETRO, 2020). A receptividade apresentou DRP inferior a 3% em todas as concentrações, e a precisão intermediária não diferiu entre os ensaios realizados em dias distintos ($p \leq 0,05$).

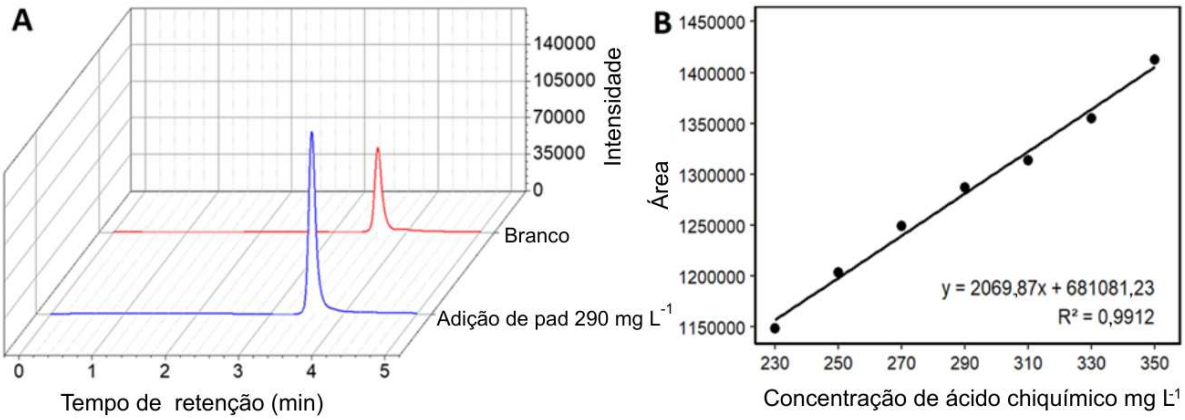


Figura 2.2. A) Cromatograma representativo da avaliação da seletividade do método HPLC. A linha vermelha representa o controle e a linha azul, o extrato vegetal da *C. diffusa* 290 mg L^{-1} do padrão de ácido chiquímico. B) Curva de calibração que representa a relação linear entre a concentração (mg/L) e a resposta instrumental (área média).

2.3.3 Quantificação de ácido chiquímico

A quantidade de ácido chiquímico nas amostras controle, não tratadas com glifosato, diferiu entre as espécies, sendo de 10 mg g^{-1} de folha maior em *C. benghalensis* com comparação a *C. diffusa* (28 mg g^{-1} de folha). *Commelina benghalensis* apresentou resposta mais precoce ao tratamento, acumulando quase 50 mg g^{-1} de folha de ácido chiquímico a 1 DAA. Essas concentrações aumentaram

gradualmente até 70 mg g^{-1} de folha até 10 DAA, seguido de declínio aos 12 DAA. Em *C. diffusa*, o acúmulo significativo ocorreu a partir de 3 DAA (50 mg g^{-1} de folha), mantendo-se estável até 10 DAA, com aumento posterior aos 12 DAA (62 mg g^{-1} de folha) (Figura 2.3.).

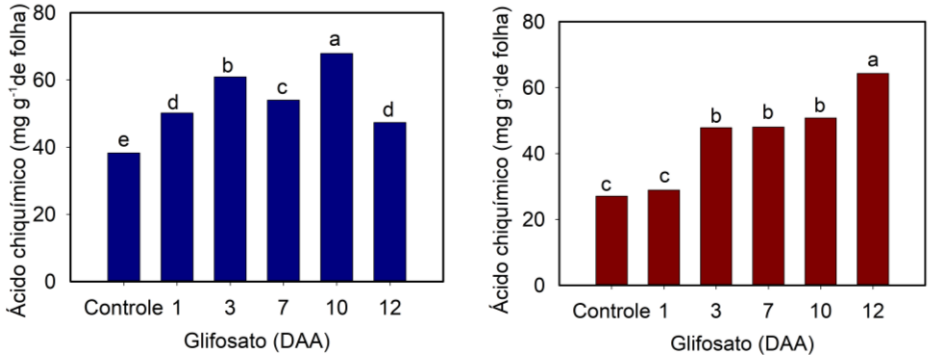


Figura 2.3. Concentração de ácido chiquímico (mg g^{-1} de folha) em *Commelina benghalensis* (azul) e *Commelina diffusa* (vermelho) após aplicação de 1000 g e. a. ha^{-1} de glifosato em diferentes dias após a aplicação (DAA). O controle corresponde a planta sem aplicação do herbicida. Letras acima das barras indicam diferenças significativas entre os tempos e o controle pelo teste Tukey ($p<0,05$; n= 6).

2.3.4 Glifosato reduz a concentração de fenólicos totais em *Commelina diffusa* e *Commelina benghalensis*

O glifosato não alterou o teor de compostos fenólicos nas folhas jovens de *C. benghalensis*, enquanto em *C. diffusa* a redução foi de 15,6% em relação ao controle. Nas folhas expandidas, os níveis diminuíram 23,9% em *C. benghalensis* e 20,6% em *C. diffusa* (Figura 2.4.)

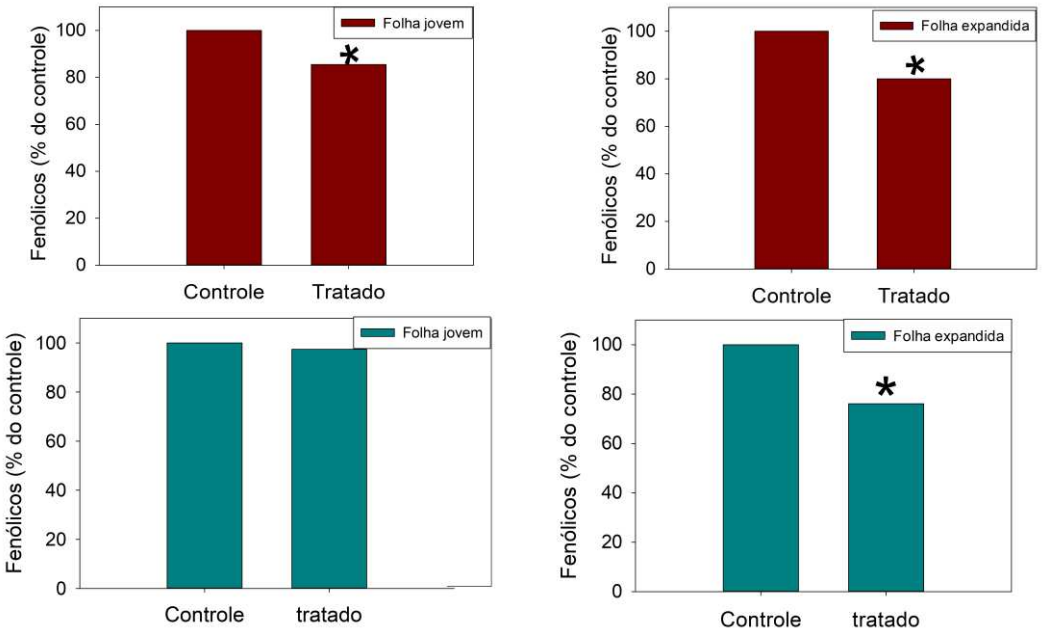


Figura 2.4. Porcentagem de fenólicos totais nas folhas de *C. diffusa* (vermelho) e *C. benghalensis* (Azul) em plantas controle e tratadas com 1000 g e.a. ha^{-1} de glifosato. A avaliação ocorreu 12 dias após a aplicação do herbicida. Letras distintas indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos, avaliadas por meio da ANOVA ($\alpha = 0,05$) (n=8).

As folhas jovens de ambas as espécies apresentaram reação positiva para compostos fenólicos em células dos parênquimas paliçádico e lacunoso, não havendo diferenças na marcação entre plantas controle e tratadas com o glifosato (2.5.a, b). O mesmo resultado foi evidenciado nas folhas expandidas de *C. benghalensis* (2.5.c, d). Já em *C. diffusa*, é possível observar que a reação positiva para fenólicos evidenciada no mesofilo das folhas do controle (Fig. 2.5.e), não foi visualizada nas folhas tratadas (Fig. 2.5.f). Flavonóides foram detectados nas folhas expandidas, principalmente próximas aos feixes vasculares, sendo a detecção mais intensa no controle que nas plantas tratadas (Fig. 2.5.g, h). O mesmo comportamento foi observado nas folhas jovens de *C. diffusa*.

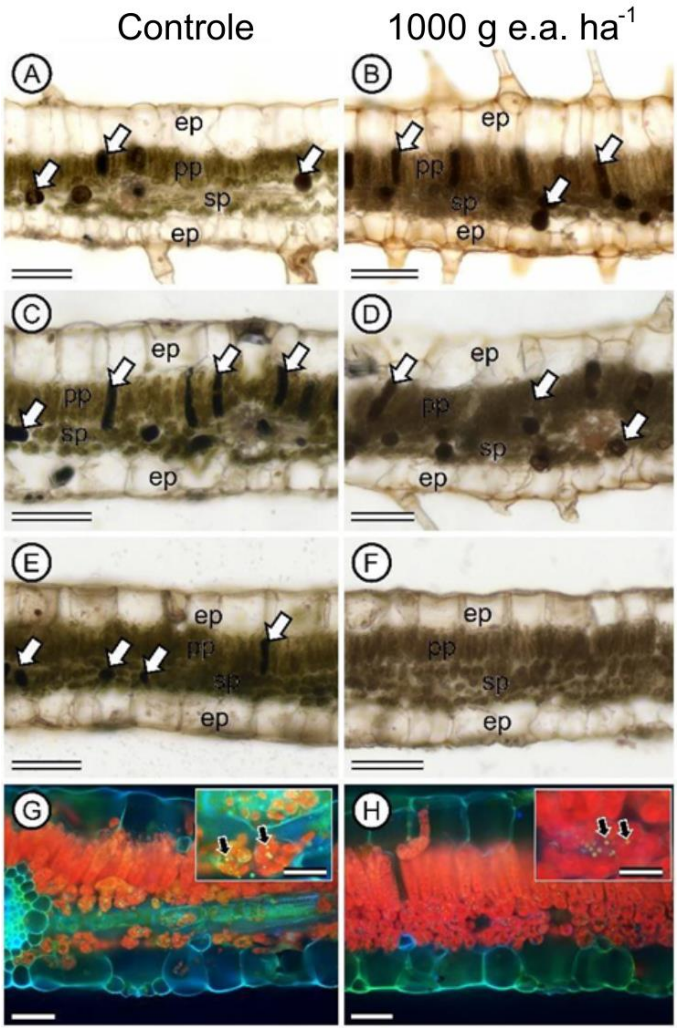


Figura 2.5. Detecção de compostos fenólicos nas folhas de *Commelina benghalensis* e *Commelina diffusa*. **A-B** Folha jovem de *C. benghalensis*, **C-D** Folha expandida de *Commelina benghalensis*, **E-F** Folha expandida de *C. diffusa,* **G-H** Folha expandida de *Commelina diffusa*, **A, C, E, G** Controle; **B, D, F, H** expostas ao glifosato. **A-F** Teste histoquímico: Formalina com Sulfato ferroso, para detecção de compostos fenólicos gerais (reação positiva indicada por cor castanho escuro). **G, H** Teste histoquímico com Acetato de Chumbo, sob fluorescência, para detecção de flavonóides (reação positiva indicada por amarelo-esverdeado). Observe ausência de reação para compostos fenólicos em folhas expandidas de *C.diffusa* **(f).** Abreviações: **ep** epiderme, **pp** parênquima paliçádico, **sp** parênquima esponjoso, **setas brancas** indicam idioblastos fenólicos, **setas pretas** indicam presença de flavonóides. Barras de escala:20 µm (detalhes g e h); 50 µm (g,h); 100 µm (a-f).

2.3.5 Glifosato altera a morfologia foliar externa e interna de *C. diffusa* e *C. benghalensis*

O glifosato induziu clorose e necrose foliar em *C. benghalensis* e *C. diffusa*. O herbicida também reduziu o crescimento das plantas, avaliado pela redução da massa seca em relação ao controle (Fig. 2.1. e 2.6.).

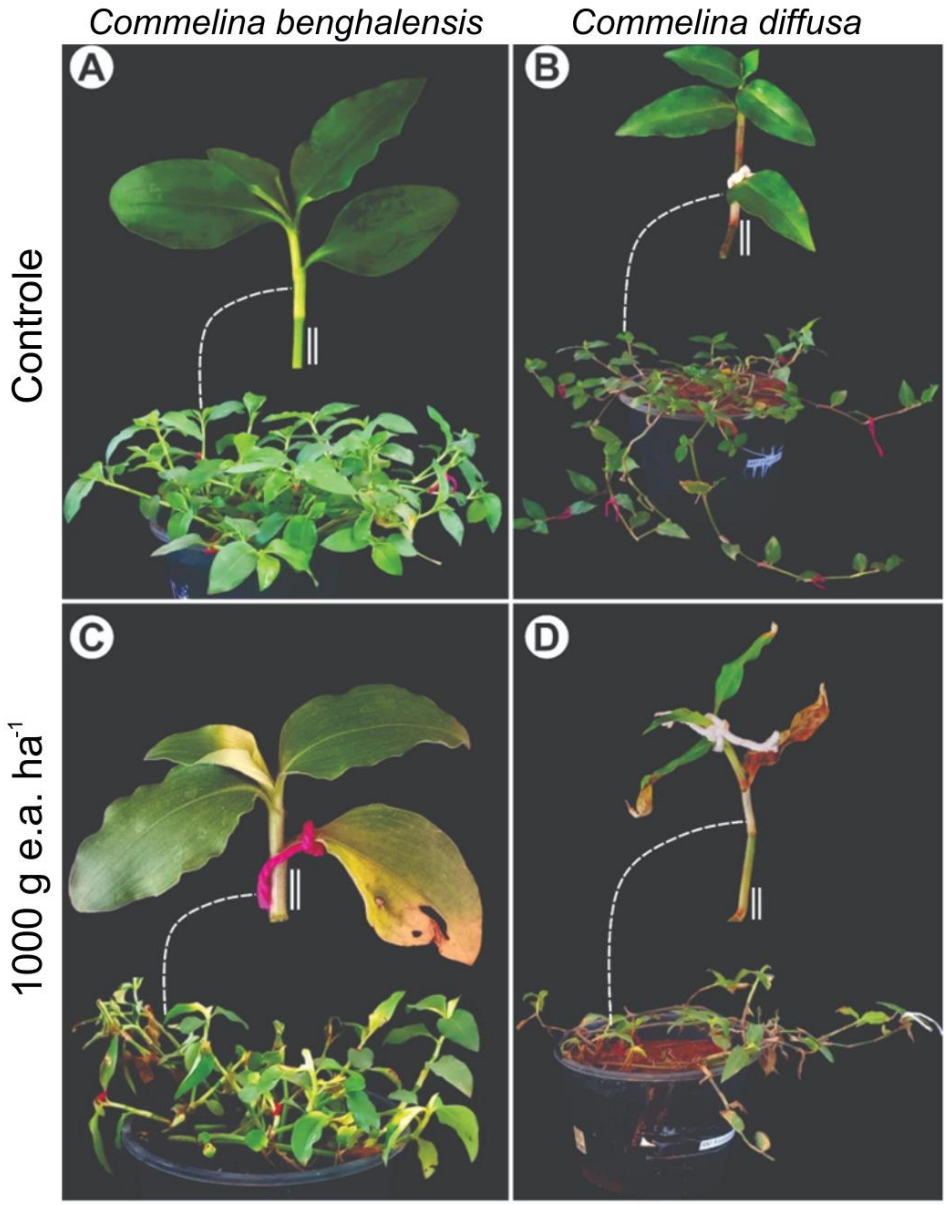


Figura 2.6. *Commelina benghalensis* (A, C) e *Commelina diffusa* (B, D), controle (A, B) e tratadas com 1000 g e.a. ha^{-1} de glifosato (C, D). Barras de escala: 1 cm.

C. benghalensis apresenta três tipos de tricomas tectores: multicelulares simples com gancho (Fig. 2.7.a), bicelulares simples e multicelulares simples (Fig.2.7.

b). Os tricomas de *C. diffusa* são semelhantes, exceto o tricoma em formato de gancho, que não está presente na espécie. As folhas de ambas as espécies são anfiestomáticas, com células-guarda e subsidiárias íntegras (Fig. 2.7.c). A epiderme apresenta células volumosas e cutícula delgada e o mesofilo é dorsiventral (Fig. 2.7.d). Uma camada estreita de colênquima está presente subjacente à epiderme de ambas as faces na região da nervura mediana em *C. diffusa* e em *C. benghalensis* (Fig. 2.7.e). Os feixes vasculares são colaterais e delimitados por bainha parenquimática (Fig. 2.7e-detalhe).

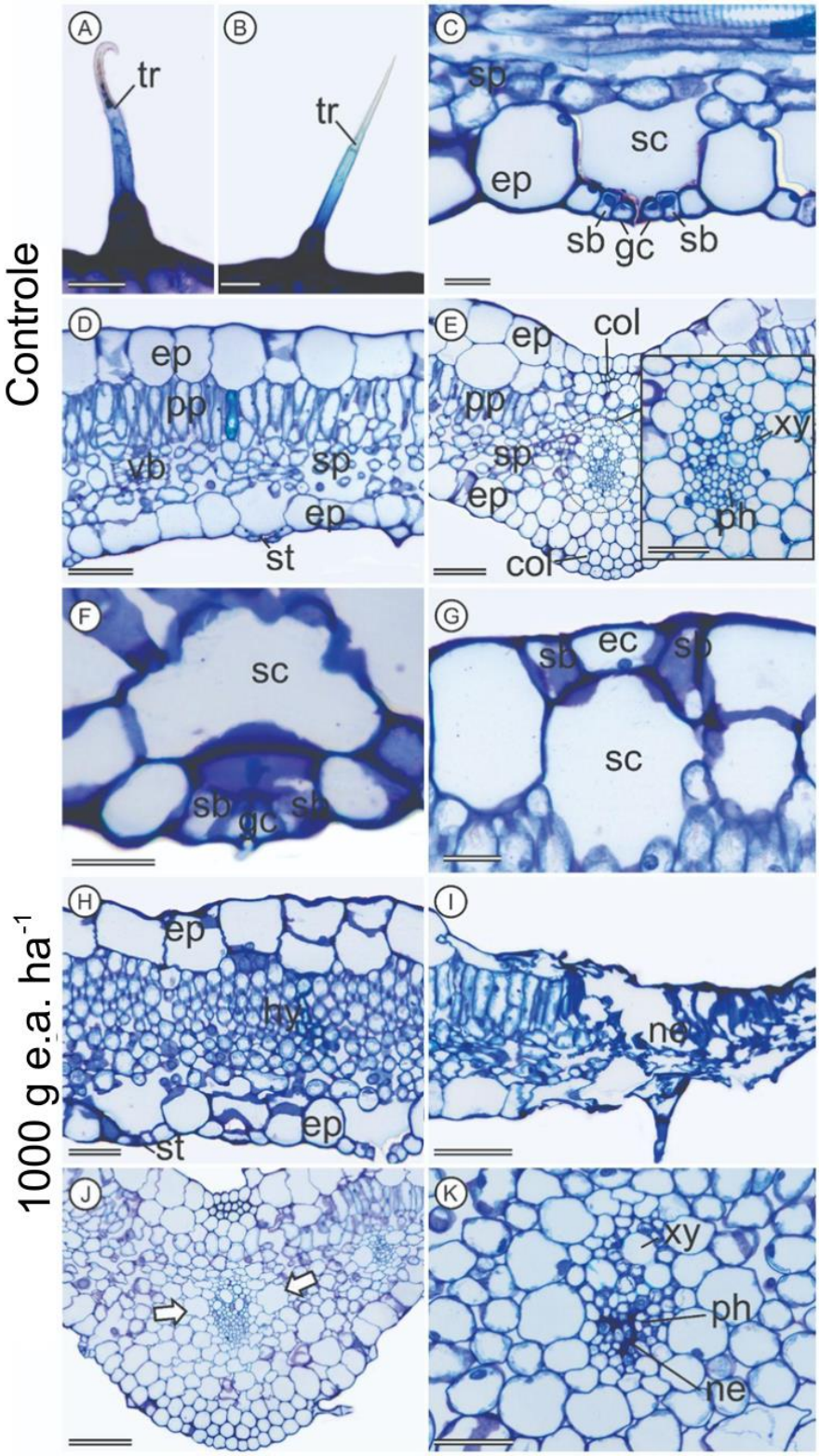


Figura 2.7. Descrição da anatomia foliar de *Commelina benghalensis* e *Commelina diffusa* e das alterações na anatômicas induzidas pelo Glifosato em folhas expandidas. **A, B, D, E, E- detalhe, H - K,** *Comelina benghalensis;* **C, F, G,** *Commelina diffusa.* **A - E** Anatomia foliar das plantas do controle, apresentando tricoma multicelular simples com gancho **(A)**; tricoma multicelular simples **(B)**; estômato com estrutura íntegra **(C);**

lâmina foliar com epiderme unisseriada e mesofilo dorsiventral **(D)**; região da nervura mediana contendo colênquima em ambas as faces **(E)** e feixes colaterais íntegros **(E - detalhe). F - K** Anatomia foliar das plantas expostas ao glifosato, apresentando alterações no complexo estomático **(F, G)**; hiperplasia no mesofilo e divisão anormal na epiderme **(H);** necroses na lâmina foliar **(I)**; aumento no volume celular e flacidez nas células do parênquima fundamental **(J)**; necrose no floema **(K)**. Secções transversais. **a-m** coloração com Azul de Toluidina. Abreviações: **col** colênquima, **ep** epiderme, **gc** células-guarda, **hy** hiperplasia, **ne** necrose, **ph** floema, **pp** parênquima paliçádico, **sb** células subsidiárias, **sc** câmara subestomática, **sp** parênquima esponjoso, **st** estômatos, **tr** tricomas, **vb** feixe vascular, **xy** xilema, **setas brancas** indicam hipertrofia e flacidez de células parenquimáticas na região da nervura. Barras de escala: 20 µm (c, g); 50 µm (a, b, d, e, f, e detalhe, i, k), 100 µm (j).

Em plantas tratadas com glifosato, a diferenciação do complexo estomático foi comprometida nas folhas expandidas de ambas as espécies, manifestando-se de duas formas: 1) células-guarda com diferenciação anormal, associadas a uma câmara subestomática mal formada (Fig. 2.7.f); 2) células epidérmicas ordinárias associadas células subsidiárias e a uma câmara subestomática desenvolvida, indicando a não diferenciação das células-guardas (Fig. 2.7.g). O parênquima paliçádico apresentou proliferação celular com alongamento comprometido, formando de duas a seis camadas compactas, indicando hiperplasia no mesofilo (Fig. 2.7.h). Além disso, foi observada divisão anormal na epiderme, resultando em regiões com mais de uma camada (Fig. 2.7.h). As manchas de necroses observadas visualmente foram comprovadas na anatomia de ambas as espécies (Fig. 2.7.i). As células parenquimáticas da nervura exibiram hipertrofia e flacidez (Fig. 2.7.j) e foi observado células necróticas no floema.

As folhas jovens das espécies de *Commelina* não apresentaram danos celulares visíveis, mas a SEM revelou alterações externas semelhantes às observadas nas folhas expandidas. Comparadas às plantas controle (Fig. 2.8. a-d), a parede periclinal externa das células ordinárias da epiderme apresentou áreas com acentuada erosão (Fig. 2.8.e) e remoção (Fig. 2.8.f) de ceras epicuticulares. Os tricomas apresentaram deformações (Fig. 2.8.g-i). O complexo estomático exibiu células subsidiárias irregulares e côncavas (Fig.2.8.j), enquanto as células-guarda mostraram cristas flácidas e/ou desintegradas (Fig. 2.8j, k). Os danos foram mais

severos na face adaxial do que na abaxial, independente do estágio de desenvolvimento da folha.

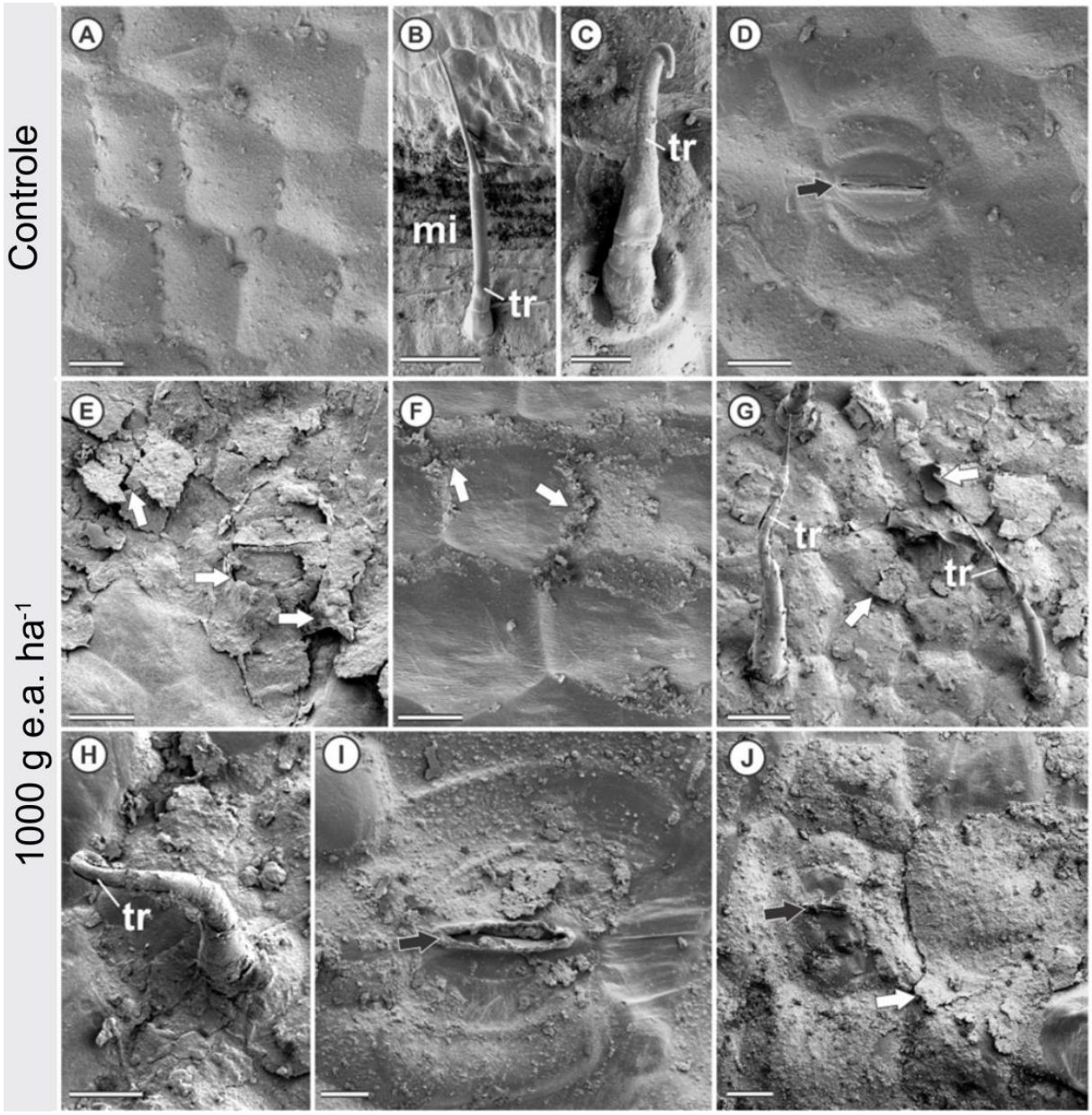


Figura 2.8. Micromorfologia da superfície foliar de *Commelina benghalensis* e *Commelina diffusa* e danos micromorfológicos induzidos pelo glifosato. **B, C, E, G, H, J** *Comelina benghalensis;* **A, D, I, F** *Commelina diffusa*. **A-D** Controle; **E-K** expostas ao glifosato. Plantas do controle apresentando superfície foliar recoberta por ceras epicuticulares **(A)**, tricomas **(B, C)** e estômatos íntegros **(D)**. Em contraste, as plantas expostas ao herbicida erosão **(E)** e remoção **(F)** das ceras epicuticulares, tricomas danificados **(G, H)**, estômatos alterados **(I, J)**. Abreviações: **ep** epidermis, **mi** midrib, **tr** trichomes, **setas brancas** indicam modificações nas ceras epicuticulares; **setas**

pretas indicam cristas estomáticas. Barras de escala: 10 µm (i); 20 µm (d, e, f); 25 µm (a, c, h, j); 50 µm (g); 100 µm (b).

2.4 Discussão

Commelina benghalensis e *C. diffusa* requereram doses maiores a 1000 g e.a. ha^{-1} para atingir 80% de controle (C_{80}) e para reduzir 80% da massa seca aérea (GR_{80}). Esses valores são superiores aos de espécies sensíveis, refletindo diferenças na absorção, translocação e metabolismo do glifosato (Faria et al., 2024). As doses de glifosato variam amplamente, de 370 a 2.520 g e.a. ha^{-1}, conforme a cultura e a espécie de planta daninha (AGROFIT, 2025). Em sistemas de sucessão com milho, soja ou algodão tolerantes ao glifosato, as doses de campo geralmente variam de 1080 a 2180 g e.a. ha^{-1}, dependendo da finalidade (dessecação pré-plantio ou manejo pós-plantio) e das espécies infestantes. A dose mais comum é de 1440 g e.a. ha^{-1} equivalente a 3 L de produto comercial (480 g e.a. L^{-1}) ou 2 kg de formulações sólidas (WG, 720 g e.a. kg^{-1}) pela praticidade de aplicação e pela possibilidade de mistura com outros herbicidas (Procópio et al., 2024). Essa concentração é próxima aos valores de C_{80} e GR_{80} estimados para *Commelina diffusa* e semelhantes aos observados para *C. benghalensis*, indicando a dificuldade de controle dessas espécies. Em algumas plantas daninhas, um controle de 80% pode ser considerado satisfatório (Vanhala et al. 2004). No entanto, aumentar o controle para 90%, pode requerer doses substancialmente maiores. No caso das espécies de *Commelina*, os valores de C_{90} e GR_{90} ultrapassariam 2000 g e.a. ha^{-1} (Figura 1). Além disso, em condições de campo, as doses necessárias para atingir 80% de controle geralmente são superiores às observadas em condições controladas.

O uso contínuo do glifosato aumenta a pressão de seleção, favorecendo a persistência de plantas tolerantes e podendo induzir a expressão de mecanismos de resistência (Kudsk et al., 2017; Procópio et al., 2024). Assim, espécies inicialmente tolerantes podem evoluir para resistência, como observado em espécies de *Chloris* (Bracamone et al., 2018; Ngo et al. 2018). No Brasil, *Euphorbia heterophylla* era considerada tolerante ao glifosato (Vargas et al. 2013), mas a exposição contínua ao herbicida levou ao desenvolvimento de resistência, expressando mecanismos semelhantes aos observados em outras espécies de plantas daninhas. Uma população do Paraná que sobreviveu à aplicação de 2160 g e.a. ha^{-1} selecionou uma

mutação dupla (*Thr102Ile* + *Pro106Thr*, conhecida como mutação TIPT) (Mendes et al., 2020). Isso sugere que a elevada tolerância observada em *C. benghalensis* e *C. diffusa* pode se intensificar caso essas espécies selecionem e expressem mecanismos de resistência.

Commelina benghalensis acumulou ácido chiquímico durante os primeiros dias após a exposição ao glifosato, confirmando a inibição da EPSPS (de Araújo et al., 2025). Aos 12 dias após a aplicação (DAA), a redução dos níveis de ácido chiquímico indica uma diminuição no acúmulo desse metabólito ao longo do tempo, o que pode estar associado a ajustes fisiológicos que reduzem o impacto do glifosato sobre a via do ácido chiquímico (Duke, 2011; Duke, 2025). Em contraste, Commelina diffusa manteve um acúmulo mais tardio de ácido chiquímico. Estudos anteriores associaram esse padrão à lenta translocação do herbicida e a características estruturais que podem restringir a mobilidade do glifosato dentro da planta, como elevadas concentrações de amido no caule (Tuffi et al., 2004; Freitas et al., 2018). O acúmulo de ácido chiquímico é um marcador precoce da ação do glifosato, mesmo em espécies tolerantes ou resistentes (de Freitas et al., 2020).

O glifosato reduziu os fenólicos totais em folhas expandidas de *C. benghalensis* e *C. diffusa.* Em folhas jovens, apenas *C. diffusa* apresentou redução, com efeito muito menor que nas folhas expandidas. Os efeitos maiores nas folhas expandidas estão associados ao acúmulo do herbicida nessas folhas e a menor taxa de renovação celular (Martinelli et al., 2020). A metabolização diferencial do glifosato pode ser responsável pela tolerância ao herbicida em *C. benghalensis* e a translocação reduzida em *C. diffusa,* mecanismos que podem afetar a redistribuição do glifosato para os pontos meristemáticos (Freitas et al., 2018; Duke; 2025). Fenólicos atuam como antioxidantes em plantas, promovendo a quelação de metais, eliminando espécies reativas de oxigênio (ROS) e inibindo a peroxidação lipídica sob condições de estresse (Saini et al., 2024). A principal via de síntese de fenólicos é a do ácido chiquímico (Shende, et al., 2024). O corismato, intermediário da via, gera aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina (Zulet-Gonzalez et al., 2023). A fenilalanina amônia-liase (PAL) converte a feninalanina em ácido cinamico, precursor de flavonoides, lignina e ácido hidroxinamicos (Li et al., 2023; Zhang et al., 2023). O glifosato, ao inibir a EPSPs, pode bloquear a formação do corismato e fenilalanina, consequentemente, a síntese de fenólicos (Chen et al., 2024).

Folhas expandidas de *C. benghalensis*, tratadas com o glifosato, apresentam marcação histoquímica para fenólicos. A reação Folin-Ciocalteu detecta redução dos fenólicos totais em comparação ao controle. Fenólicos visíveis refletem compostos localizados, enquanto a quantificação total, avalia toda a fração de fenólicos extraíveis. Essas diferenças explicam as discrepâncias entre os resultados obtidos (Kupina et al., 2018; Ghosh, et al., 2019).

As espécies, expostas ao glifosato, apresentaram clorose, necrose e redução de crescimento, mais evidentes em folhas expandidas, do que em folhas jovens. Essa diferença de sintomas, associadas ao estágio de desenvolvimento, reflete a menor translocação do glifosato para regiões metabolicamente ativa, resultando em menores danos nos meristemas (Radziewicz et al., 2021; Adriano et al., 2021). A permanência e atividade do ápice caulinar, garante a rebrota de *C. benghalensis* e *C. diffusa*, permitindo que essas espécies continuem o ciclo reprodutivo e reabasteçam o banco de sementes e propágulos (Freitas et al., 2018). Essa é uma característica comum de espécies tolerantes, que mantêm populações, mesmo sob pressão do herbicida (Monquero et al., 2004; Leon et al., 2022).

As alterações no padrão de divisão e diferenciação celular, observadas na epiderme e mesofilo, são distúrbios resultantes da inibição da via do ácido chiquímico pelo herbicida, que reduz a síntese de aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina (Almeida et al., 2024). O triptofano é um precursor direto da auxina (AIA) (Solanki et al., 2023), enquanto a fenilalanina origina flavonóis, que regula o transporte polar de auxina e mantêm o equilíbrio redox celular (Casanova-Sáez et al., 2021). A deficiência desses metabólitos compromete a produção e distribuição de auxina, o que pode explicar a má formação das células-guarda, hiperplasia e alongamento comprometido. A hiperplasia no mesofilo, pode ser interpretada como um mecanismo compensatório e temporário ao colapso celular, necrose foliar e perda de área fotossintética, visto que essas são espécies tolerantes (Tuffi et al., 2009; Meloni et al., 2021).

As necrose podem estar associadas ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), induzido pelo glifosato e seu principal metabólito, ácido aminometilfosfônico (AMPA). A ROS, causa peroxidação lipídica, rompimento de membranas e colapso celular (Traxler et al., 2023). A inibição da via do chiquimato pelo herbicida compromete a síntese de lignina e outros compostos fenólicos

estruturais, importantes na integridade mecânica das paredes celulares, com efeitos na diferenciação dos elementos de vaso do metaxilema (de Araújo et al., 2025). A deficiência de lignina, juntamente com a desregulação da auxina, contribui para hipertrofia celular e formação de feixes vasculares flácidos e desorganizados, culminando no colapso funcional do tecido vascular (Casanova-Sáez et al., 2021).
Na epiderme, a remoção das ceras epicuticulares, erosão da parede periclinal externa, revelada via SEM indica a degradação precoce da cutícula, que pode ser resultante da peroxidação lipídica causadas pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (De Faria et al., 2023). A oxidação de lipídios e compostos fenólicos reduz a integridade da camada cerosa e a deposição de cutina e lignina, resultando em uma superfície foliar mais permeável (Reynoud et al., 2021). A maior severidade dos sintomas na face adaxial está associada a maior área de contato com o herbicida que na face abaxial (Johnson & Baucom, 2024). Os efeitos do glifosato, mostram que mesmo em espécies tolerantes, ocorre danos nas superfícies e que comprometem a barreira cuticular, o que pode resultar em desequilíbrio da regulação hídrica, na susceptibilidade a patógenos e desempenho fisiológico das plantas.

2.5 Conclusão

Commelina benghalensis e *C. diffusa* são tolerantes ao glifosato, mas apresentam alterações anatômicas e fisiológicas após a aplicação. O herbicida afeta processos metabólicos essenciais, limitando o crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo a *C. benghalensis* apresenta maior capacidade de compensação fisiológica frente ao glifosato. A inibição da rota do ácido chiquímico reduz a produção de compostos fenólicos, comprometendo a defesa e aumentando a susceptibilidade a patógenos e estresses abióticos. Esses resultados indicam perspectivas para estudos complementares com parâmetros metabólicos e fisiológicos, que investiguem quais os mecanismos de tolerância/resistência presentes nas espécies, que permitem completar o ciclo de vida, mesmo sofrendo danos estruturais e químicos. Além disso, reforçam a importância de estratégias de manejo integrado que considerem a biologia de cada espécie.

2.6 Referências bibliográficas

Adriano, R.C., Mendes, K.F., Alcántara-de La Cruz, R., do Nascimento, J.L.M., Ferreira, L.R., Tornisielo, V.L., 2021. Effect of Fertiactyl® on the absorption and translocation of 14C-glyphosate in young eucalyptus plants. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**. 56, 3, 235-240. https://doi.org/10.1080/03601234.2021.1872325.

AGROFIT, 2025. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura. https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons (Acesso em 20 jun. 2025)

Almeida, A.M., Marchiosi, R., Abrahão, J., Constantin, R.P., dos Santos, W.D., Ferrarese-Filho, O., 2024. Revisiting the shikimate pathway and highlighting their enzyme inhibitors. **Phytochemistry Reviews**. 23, 2, 421-457. https://doi.org/10.1007/s11101-023-09889-6.

Bracamonte, E., Silveira, H.M.D., Alcántara-de la Cruz, R., Domínguez-Valenzuela, J.A., Cruz-Hipolito, H.E., De Prado, R., 2018. From tolerance to resistance: Mechanisms governing the differential response to glyphosate in *Chloris barbata*. **Pest Management Science**, 74, 5, 1118-1124. https://doi.org/10.1002/ps.4874.

Carvalho, S.J.P., 2005. Curva de dose resposta para avaliação do controle dos fluxos de emergência de plantas daninhas. **Planta Daninha**, 23, 3, 535-542. https://doi.org/10.1590/S0100-83582005000300018.

Casanova-Sáez, R., Mateo-Bonmatí, E., Ljung, K., 2021. Auxin metabolism in plants. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. 13, 3, a039867. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a039867.

Charrière-Ladreix, C., 1976. Histochimie des flavonoïdes: méthodes et applications, first ed. Masson, Paris.

Chen, J., Li, Z., Yu, H., Cui, H., Li, X., 2024. Affecting of Glyphosate Tolerance and Metabolite Content in Transgenic *Arabidopsis thaliana* Overexpressing EPSPs Gene from *Eleusine indica*. **Plants**. 14, 1, 78. https://doi.org/10.3390/plants14010078.

Cruz, C.E.S., de Freitas-Silva, L., Ribeiro, C., da Silva, LC, 2021. Physiological and morphoanatomical effects of glyphosate in *Eugenia uniflora*, a Brazilian plant species native to the Atlantic Forest biome. **Environmental Science and Pollution Research**. 28, 21334-21346. https://doi.org/10.1007/s11356-020-12003-4.

de Araújo, H.H., Marinato, C.S., Coelho, D.G., Oliveira, L.A., de Oliveira, J.A., Clarindo, W.R., da Silva, L.C., 2025. Multidimensional effects of a glyphosate-based herbicide on *Joannesia princeps Vell.* (Euphorbiaceae): Morphoanatomical, metabolic, and genotoxic biomarkers as indicators of damage in a non-target native tree species. **Journal of Hazardous Materials**, 492, 138038. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2025.138038.

de Faria, G.S., Carlos, L., Jakelaitis, A., de Freitas, S.T.F., Vicentini, T.A., Silva, I.O.F., Vitorino, L.C., 2023. Hormetic effect caused by sublethal doses of glyphosate on *Toona ciliata* M. Roem. **Plants**, 12, 24, 4163. https://doi.org/10.3390/plants12244163.

de Freitas S. L., de Araújo, T.O., Nunes-Nesi, A., Ribeiro, C., Costa, A.C., Silva, L.C., 2020. Evaluation of morphological and metabolic responses to glyphosate exposure in two neotropical plant species. **Ecological Indicators**. 113, 106246. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106246.

Duke, S.O., 2025. Metabolic Degradation of Glyphosate in Soil Microbes, Endophytes, Crops, and Weeds, in: Vijay K., Nandula, R.B. (Eds.), Resistance in Weeds from Herbicide Metabolism, John Wiley & Sons**,** Hoboken**,** pp. 41-80.

Duke, S.O., 2011. Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and-susceptible crops and weeds. **Journal of agricultural and food chemistry**. 59,11, 5835-5841. https://doi.org/10.1021/jf102704x.

Charrière-Ladreix, C., 1976. Histochimie des flavonoïdes: méthodes et applications, first ed**.** Masson, Paris.

Embrapa, 2018. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Quinta ed. Embrapa, Brasília.

Faria, G.S., Carlos, L., Vasconcelos-Filho, S.C., Freitas, S.T.F., Lourenço, L.L., Sousa, A.C.D., Vitorino, L.C., 2024. Tolerance of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne. to glyphosate. **Brazilian Journal of Biology**. 84, e279984. https://doi.org/10.1590/1519-6984.279984.

Freitas, N., Freitas, F., Furtado, I., Teixeira, M., Silva, V., 2018. Misturas de Herbicidas para o Controle de trapoeraba e o Efeito da Deriva na Cultura do Café**. Planta Daninha**. 36, e018169798. https://doi.org/10.1590/S0100-83582018360100047.

Ghimire, B.K., Son, N.Y., Kim, S.H., Yu, C.Y., Chung, I.M., 2017. Evaluating water deficit and glyphosate treatment on the accumulation of phenolic compounds and photosynthesis rate in transgenic *Codonopsis lanceolata* (Siebold & Zucc.) Trautv. over-expressing γ-tocopherol methyltransferase (γ-tmt) gene. **3 Biotech**. 7, 1-12. https://doi.org/10.1007/s13205-017-0795-5.

Ghosh, P., Dutta, A., Biswas, M., Biswas, S., Hazra, L., Nag, S.K., Chatterjee, S., 2019. Phytomorphological, chemical and pharmacological discussions about *Commelina benghalensis* Linn. (Commelinaceae): A review. **The Pharma Innovation Journal**, 8, 6, 12-18.

Hajiboland, R., Nazari, F., Mohammadzadeh, P., Kahneh, E., Shafagh, Z., Nezhadasad, B., Moradi, A., 2024. Effect of aluminum on growth and herbicide resistance in *Commelina communis* and *Tradescantia fluminensis*, two invasive weed species in tea gardens. **Biological Invasions**. 26, 7, 2329-2349. https://doi.org/10.1007/s10530-024-03318-1.

ICH, 2005. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf. (accessed 14 March 2025).

INMETRO, 2020. Orientação sobre validação de métodos analíticos. https://www.gov.br/cdtn/pt-br/centrais-de-conteudo/documentos-cgcre-abnt-nbr-iso-iec-17025/doq-cgcre-008/view (accessed 14 March 2025).

Johansen, D.A., 1940. Plant Microtechnique, first ed. McGraw-Hill Book Company, New York.

Johnson, N.M., Baucom, R.S., 2024. The double life of trichomes: understanding their dual role in herbivory and herbicide resistance. **Evolution**. 78, 6, 1121-1132. https://doi.org/10.1093/evolut/qpae048.

Khan, A., Kanwal, F., Ullah, S., Fahad, M., Tariq, L., Altaf, M.T., Zhang, G., 2025. Plant secondary metabolites—Central regulators against abiotic and biotic stresses. **Metabolites.** 15, 4, 276. https://doi.org/10.3390/metabo15040276.

Kudsk P., Moss S., 2017. Herbicide Dose: What Is a Low Dose?, in: Duke, S.O, Kudsk P., Solomon K. (Eds.), Pesticide dose: Effects on the environment and target and non-target organisms. **ACS Publications**, Washington, pp. 15-24.

Kupina, S., Fields, C., Roman, M.C., Brunelle, S.L., 2018. Determination of total phenolic content using the Folin-C assay: Single-laboratory validation. **Journal of AOAC international**. 101, 5, 1466-1472. https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0031.

Larini, W.F., Albrecht, A.J.P., Neuberger, D.C., Barroso, A.A., Albrecht, L.P., 2025. Interaction of glyphosate with auxin herbicides for control of Benghal dayflower (*Commelina benghalensis*) at advanced growth stages. **Weed Technology.** 39, e56. https://doi.org/10.1017/wet.2025.23.

Leon, R.G., Creamer, N., Reberg-Horton, S.C., Franzluebbers, A.J., 2022. Eradication of *Commelina benghalensis* in a long-term experiment using a multistakeholder governance model: a case of regulatory concerns defeating ecological management success. Invasive **Plant Science and Management**. 15, 3, 152-159. https://doi.org/10.1017/inp.2022.23.

Li, G., Song, C., Manzoor, M.A., Li, D., Cao, Y., Cai, Y., 2023. Functional and kinetics of two efficient phenylalanine ammonia lyase from *Pyrus bretschneide*ri. **BMC Plant Biology**, 23, 1, 612. https://doi.org/10.1186/s12870-023-04586-0.

Martinelli, R., Rufino, L.R., de Melo, A.C., Alcantara-de La Cruz, R., da Silva, J.R., Boaretto, R.M., de Azevedo, F.A., 2022. Glyphosate excessive use chronically disrupts the shikimate pathway and can affect photosynthesis and yield in citrus

trees. **Chemosphere**. 308, 136468. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136468.

Matallo, M.B., Almeida, S.D.B., Cerdeira, A.L., Franco, D.A., Blanco, F.M.G., Menezes, P.T.C, Duke, S.O., 2009. Microwave-assisted solvent extraction and analysis of shikimic acid from plant tissues. **Planta Daninha**. 27, 987-994. https://doi.org/10.1590/S0100-83582009000500012.

Meloni, D., Martínez, C.A., Targa, M.G., Fraño, A., Catán, A., 2021. Physiological and anatomical responses of *Eucalyptus camaldulensis* leaves to glyphosate application. **Advances in Forestry Science**. 8, 3, 1535-1543. https://doi.org/10.34062/afs.v8i3.12483.

Mendes, R.R., Takano, H.K., Leal, J.F., Souza, A.S., 2020. Evolution of EPSPS double mutation imparting glyphosate resistance in wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.). **PLoS One**. 15, 9, e0238818. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238818.

Monquero, P.A., Christoffoleti, P.J., Osuna, M.D., De Prado, R.A., 2004. Absorption, translocation and metabolism of glyphosate by plants tolerant and susceptible to this herbicide. **Planta Daninha**. 22, 445-451. https://doi.org/10.1590/S0100-83582004000300015.

Ngo, T.D., Malone, J.M., Boutsalis, P., Gill, G., Preston, C., 2018. EPSPS gene amplification conferring resistance to glyphosate in windmill grass (*Chloris truncata*) in Australia. **Pest Management Science**. 74, 5, 1101-1108, 2018. https://doi.org/10.1002/ps.4573.

O'Brien, T.P., 1964. Polychromatic staining of plant cell wall by toluidine blue-O. **Protoplasma**. 59, 69-76. https://doi.org/10.1007/BF01248568.

Procópio, S.D.O., Barizon, R.R.M., Pazianotto, R.A.A., Morandi, M.A.B., Braz, G.B.P., 2024. Impacts of Weed Resistance to Glyphosate on Herbicide Commercialization in Brazil. **Agriculture**. 14, 12, 2315, 2024. https://doi.org/10.3390/agriculture14122315.

R Core Team, 2019. R: A Language and Environment for Statistical Computing (Version 3.6.1) [software]. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://www.R-project.org/.

Radziewicz, M., Wolber, D.M., Pütz, T., Hofmann, D., 2025. Altered Translocation Pattern as Potential Glyphosate Resistance Mechanism in Blackgrass (*Alopecurus myosuroides*) Populations from Lower Saxony. **International Journal of Plant Biology**. 16, 2, 45. https://doi.org/10.3390/ijpb16020045.

Reynoud, N., Petit, J., Bres, C., Lahaye, M., Rothan, C., Marion, D., Bakan, B., 2021. The complex architecture of plant cuticles and its relation to multiple biological functions. **Frontiers in Plant Science**. 12, 782773. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.782773.

Saini, N., Anmol, A., Kumar, S., Wani, A.W., Bakshi, M., Dhiman, Z., 2024. Exploring phenolic compounds as natural stress alleviators in plants-a comprehensive review. **Physiological and Molecular Plant Pathology.** 133, 102383. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2024.102383.

Sandhu, P.K., Leonard, E., Nandula, V., Tharayil, N., 2023. Global metabolome of palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) populations highlights the specificity and inducibility of phytochemical responses to abiotic stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 71, 7, 3518-3530. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c07162.

Sari, K.R.P., Ikawati, Z., Danarti, R., Hertiani, T., 2023. Micro-titer plate assay for measurement of total phenolic and total flavonoid contents in medicinal plant extracts. Arabian **Journal of Chemistry.** 16, 9, 105003. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.105003.

Shende, V.V., Bauman, K.D., Moore, B.S., 2024. The shikimate pathway: gateway to metabolic diversity. **Natural Product Reports**. 41, 4, 604-648. https://doi.org/10.1039/d3np00037k.

Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1964. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture.** 16, 3, 144-158. https://doi.org/10.5344/ajev.

Solanki, M., Shukla, L.I., 2023. Recent advances in auxin biosynthesis and homeostasis. **3 Biotech**. 13, 9, 290. https://doi.org/10.1007/s13205-023-03709-6.

Traxler, C., Gaines, T.A., Küpper, A., Luemmen, P., Dayan, F.E., 2023. The nexus between reactive oxygen species and the mechanism of action of herbicides. **Journal of Biological Chemistry.** 299, 11, 105267. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105267.

Tuffi Santos, L.D., Meira, R.M.S.A., Santos, I.C., Ferreira, F.A., 2004. Efeito do glifosato sobre a morfoanatomia das folhas e do caule de *Commelina diffusa* e *C. benghalensis*. **Planta Daninha.** 22, 101-107. https://doi.org/10.1590/S0100-83582004000100013.

Tuffi Santos, L.D., Sant'Anna-Santos, B.F., Meira, R.M.S.A., Ferreira, F.A., Tiburcio, R.A.S., Machado, A.F.L., 2009. Leaf anatomy and morphometry in three eucalypt clones treated with glyphosate. **Brazilian Journal of Biology.** 69, 129-136. https://doi.org/10.1590/s1519-69842009000100016.

Vanhala, P., Kurstjens, D., Ascard, J., Bertram, A., Cloutier, D.C., Mead, A., Raffaelli, M., Rasmussen, J., 2004. Guidelines for physical weed control research: flame weeding, weed harrowing and intra-row cultivation. In: Proceedings of the 6th EWRS Workshop on Physical and Cultural Weed Control, Lillehammer, Norway, 8–10 March 2004, pp. 208–239.

Vargas, L., Nohatto, M.A., Agostinetto, D., Bianchi, M.A., Paula, J.M., Polidoro, E., Toledo, R.E., 2013. Práticas de manejo e a resistência de *Euphorbia heterophylla* aos inibidores da ALS e tolerância ao glifosato no Rio Grande do Sul. **Planta Daninha**. 31, 427-432. https://doi.org/10.1590/S0100-83582013000200021.

Zhang, H., Zhang, X., Zhao, H., Hu, J., Wang, Z., Yang, G., Wan, H., 2023. Genome-wide identification and expression analysis of *phenylalanine ammonia-lyase* (*PAL*) family in rapeseed (*Brassica napus* L.). **BMC Plant Biology**. 23, 1, 481. https://doi.org/10.1186/s12870-023-04472-9.

CAPÍTULO 3

RESISTÊNCIA AO GLIFOSATO NO SÍTIO-ALVO EM *Digitaria insularis*: EVIDÊNCIAS DA MUTAÇÃO PRO106THR E DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE *EPSPS*

Resumo: A resistência ao glifosato em *Digitaria insularis* tem aumentado em sistemas agrícolas anuais e perenes no Brasil, ultrapassando 18 milhões de hectares em 2025, comprometendo a eficácia do controle químico dessa espécie. Este estudo caracterizou os mecanismos de resistência ao glifosato relacionados ao sítio de ação (*target-site resistance* – TSR) em um biótipo de *D. insularis* coletado em uma lavoura de café na região da Zona da Mata de Minas Gerais. Os biótipos resistentes (B2 e B3) sobreviveram à dose comercial de glifosato (1440 g e.a. ha^{-1}), enquanto o biótipo suscetível (B1) apresentou 100% de controle nessa dose. O fator de resistência (FR) variou de 1,9 a 3,0 para B2 e de 2,9 a 4,6 para B3, com base nos valores de LD_{50} e GR_{50}, indicando resistência de baixo nível. Aos 7 dias após a aplicação, o biótipo suscetível acumulou aproximadamente 5 µg $disco^{-1}$ de ácido chiquímico na dose comercial. Nenhum acúmulo foi observado nos biótipos resistentes nessa dose, o acúmulo ocorreu apenas em B2 (≈4,8 µg $disco^{-1}$) na dose equivalente a três vezes a recomendada, enquanto B3 manteve concentrações semelhantes entre as doses avaliadas. Os biótipos resistentes apresentaram um aumento modesto no número de cópias do gene *EPSPS*, de aproximadamente 20% em B2 e 40% em B3. O sequenciamento revelou a mutação Pro106Thr em 100% dos indivíduos resistentes, enquanto essa mutação esteve ausente no biótipo suscetível. Esses resultados demonstram a ocorrência combinada de dois mecanismos de resistência relacionados ao sítio de ação (mutação e amplificação gênica) em *D. insularis*, destacando a necessidade de monitoramento precoce e manejo integrado para retardar a evolução da resistência ao glifosato em sistemas cafeeiros.

Palavras-chave: Ácido chiquímico, mecanismo de ação, mutação no sítio-alvo, planta daninha.

3.1 Introdução

O glifosato destaca-se como um herbicida não seletivo e de amplo espectro, amplamente utilizado no manejo de plantas daninhas em lavouras de café (Gaines et al., 2019). Esse herbicida inibe a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), essencial na via do ácido chiquímico, responsável pela síntese de aminoácidos aromáticos nas plantas (Almeida et al., 2024; Pagnoncelli et al., 2024). O uso contínuo e recorrente do glifosato aumenta a pressão de seleção, favorece a evolução de biótipos resistentes de plantas daninhas e compromete a eficácia do manejo a longo prazo (Onofre et al., 2021). Embora esse herbicida apresente baixa frequência natural do alelo de resistência (5×10^{-8}) (Pagnoncelli et al., 2024), sua utilização repetida promove a seleção e a disseminação de populações resistentes em diversas espécies.

Digitaria insularis representa uma das principais espécies de plantas daninhas em sistemas de produção de café, pois reduz significativamente a disponibilidade de nutrientes e o crescimento da cultura (Carvalho et al., 2013). O manejo dessa espécie baseia-se predominantemente no uso de glifosato, frequentemente como única estratégia de controle, o que contribui para a rápida evolução de biótipos resistentes no Brasil (Amaral et al., 2023). As áreas infestadas expandiram-se consideravelmente nas últimas décadas, passando de ocorrências localizadas para mais de 18 milhões de hectares em 2025 (Alcántara-de la Cruz et al., 2026). *Digitaria insularis* apresenta hábito de crescimento perene, metabolismo C4 e elevada capacidade reprodutiva por meio de sementes e rizomas, características que favorecem sua persistência e disseminação em sistemas agrícolas (Galon et al., 2024; Souza et al., 2024). Essa combinação de estratégias reprodutivas, associada ao rápido acúmulo de biomassa em estádios mais avançados de desenvolvimento, aumenta sua competitividade e dificulta seu controle (Cavalieri et al., 2021; Moisinho et al., 2024).

O Brasil, maior produtor e exportador mundial de café, depende de sistemas de produção altamente intensivos, nos quais o controle químico de plantas daninhas é amplamente utilizado. Cafeicultores da região da Zona da Mata de Minas Gerais relatam falhas no controle de *D. insularis*, mesmo quando utilizam as doses recomendadas de herbicidas e tecnologias adequadas de aplicação. A identificação

dos mecanismos de resistência é fundamental, uma vez que diferentes mecanismos requerem estratégias específicas de manejo (Riechers et al., 2024).

Os mecanismos de resistência a herbicidas são classificados em resistência relacionada ao sítio de ação (*target-site resistance* – TSR) e resistência não relacionada ao sítio de ação (*non-target-site resistance* – NTSR). A TSR ao glifosato envolve principalmente mutações ou amplificação do gene *EPSPS*, enquanto a NTSR inclui alterações na absorção e translocação do herbicida (Gaines et al., 2019). A rotação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação é uma estratégia eficaz para o manejo de casos de TSR (Busti et al., 2020), enquanto os mecanismos de NTSR tendem a ser mais complexos e podem reduzir a eficácia de múltiplos herbicidas (Amaral et al., 2023).

O monitoramento precoce e a caracterização dos níveis e mecanismos de resistência subsidiam estratégias de manejo integrado de plantas daninhas, reduzem a pressão de seleção e limitam a disseminação de biótipos resistentes (Simard e Laforest, 2024). Assim, este estudo teve como objetivo identificar os níveis e os mecanismos de resistência ao glifosato em dois biótipos de *Digitaria insularis* coletados em lavouras cafeeiras da região da Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Material vegetal

Sementes de biótipos de *Digitaria insularis* foram coletadas em áreas com diferentes históricos de manejo na região da Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil. O biótipo B1 (supostamente suscetível) foi coletado em uma área de vegetação nativa sem histórico de aplicação de glifosato, em Viçosa, MG (20°45'14.00" S; 42°52'54.00" W). Os biótipos B2 e B3 foram coletados em duas lavouras cafeeiras distintas submetidas a aplicações frequentes de glifosato, localizadas em Coimbra, MG (21°00'00.64" S; 42°30'49.48" W) e Viçosa, MG (20°46'12.32" S; 42°52'07.57" W), respectivamente.

O biótipo B1 não sobreviveu à aplicação de glifosato na dose recomendada em campo, enquanto os biótipos B2 e B3 sobreviveram à aplicação de 1440 g e.a. ha^{-1} (Trop®, 480 g e.a. L^{-1}). Os biótipos B2 e B3 foram submetidos à seleção nessa dose,

e as sementes produzidas pelas plantas sobreviventes foram utilizadas nos experimentos subsequentes. O biótipo B1 foi utilizado como controle suscetível.

3.2.2 Avaliação do fator de resistência (FR)

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado. As unidades experimentais consistiram em vasos plásticos com capacidade de 0,35 dm³, preenchidos com solo. Foram semeadas cinco sementes por vaso a 2 cm de profundidade, realizando-se o desbaste no estádio de duas folhas para manter duas plantas por vaso. Cada dose contou com oito repetições. As plantas foram irrigadas diariamente para manter a umidade do solo próxima à capacidade de campo.

As plantas dos biótipos B1, B2 e B3 foram tratadas com glifosato nas doses de 0, 180, 360, 720, 1440, 2880, 5760 e 11520 g e.a. ha^{-1} quando atingiram aproximadamente 10 cm de altura. As aplicações foram realizadas com pulverizador costal pressurizado por CO_2, equipado com pontas de jato plano TT 110.02 espaçadas em 50 cm, utilizando volume de calda de 165 L ha^{-1} e pressão constante de 200 kPa. As aplicações foram realizadas a 50 cm do alvo, sob temperatura de 27 °C, umidade relativa de 80% e condições de céu nublado.

O controle visual e a massa seca da parte aérea foram avaliados aos 21 dias após a aplicação (DAA). O controle visual foi determinado por dois avaliadores independentes utilizando escala de 0 a 100%, em que 0 corresponde à ausência de injúrias e 100 à morte das plantas (Miranda et al., 2021). A massa seca da parte aérea foi determinada após secagem do material vegetal em estufa de circulação forçada de ar a 60 °C até peso constante, seguida de pesagem em balança analítica, sendo os resultados expressos em porcentagem em relação à testemunha (plantas não tratadas de cada população).

Os dados de controle visual e redução da massa seca da parte aérea (%) foram utilizados para estimar os valores de LD_{50} e LD_{90} (doses necessárias para proporcionar 50% e 90% de controle visual, respectivamente) e de GR_{50} e GR_{90} (doses necessárias para reduzir a massa seca da parte aérea em 50% e 90%, respectivamente). Esses parâmetros foram obtidos pelo ajuste de um modelo logístico sigmoidal aos dados, por meio de regressão não linear em função da dose de

glifosato, com os limites inferior e superior fixados em 0 e 100, respectivamente. As análises foram realizadas no software OriginPro (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA).

$$Y = \frac{a}{1 + (\frac{x}{x0})^b}$$

Em que Y representa o controle visual (%) ou a massa seca da parte aérea expressa em porcentagem da testemunha não tratada; x é a dose do herbicida (g e.a. ha^{-1}); a corresponde à assíntota superior da curva; x_0 representa a dose responsável por 50% da resposta; e b descreve a inclinação da curva em torno de x_0. A partir do modelo ajustado foram estimados os valores de LD_{50} e LD_{90}, correspondentes às doses necessárias para proporcionar 50% e 90% de controle visual, respectivamente, bem como os valores de GR_{50} e GR_{90}, correspondentes às doses necessárias para reduzir a massa seca da parte aérea em 50% e 90%. Os valores de C_{50} e GR_{50} foram utilizados para o cálculo do fator de resistência (FR), definido como a razão entre os valores estimados para o biótipo resistente e o biótipo suscetível (FR = R/S) (Avila et al., 2005).

3.2.3. Condições de Cultivo das Plantas para análises bioquímicas e moleculares

Plantas de *Digitaria insularis* foram cultivadas em câmara de crescimento utilizando bandejas (0,125 m^2) com fundo perfurado. As bandejas foram preenchidas com uma mistura de substrato comercial e vermiculita na proporção de 1:1 (v). Foram semeadas 40 sementes por bandeja, a 2 cm de profundidade. A câmara de crescimento foi mantida a 30/28 °C (12 h de luz/12 h de escuro), com intensidade luminosa de 300 µmol m^{-2} s^{-1}. As plantas foram irrigadas conforme necessário.

As plantas foram tratadas com glifosato quando atingiram aproximadamente 10 cm de altura. O herbicida utilizado foi Fortin Green® (360 g e.a. L^{-1}, Key, Tàrrega, Catalunha, Espanha). As doses aplicadas corresponderam a 0 (controle), 1× e 3× a dose recomendada em campo (1440 g e.a. ha^{-1}), equivalendo a 0, 1440 e 4320 g e.a. ha^{-1}. As aplicações foram realizadas utilizando um aerógrafo (*airbrush*) (Definik, Sagola, Vitoria-Gasteiz, Espanha) acoplado a um compressor (Werther, Breverato, Itália; 60 W, reservatório de 10 L e pressão de 2,5 bar), mantendo-se um volume de

pulverização constante de 6,25 mL por bandeja (0,125 m²), mediante ajuste da concentração do herbicida de acordo com a dose desejada.

As folhas foram coletadas aos 7 dias após a aplicação (DAA). Discos foliares foram retirados da folha mais jovem, enquanto o restante das folhas foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a −80 °C. As folhas provenientes da mesma planta foram agrupadas e consideradas uma repetição biológica. As amostras foram maceradas em moinho Retsch MM200, e a quantidade necessária de tecido vegetal foi separada para cada análise.

3.2.4 Acúmulo de ácido chiquímico

O acúmulo de ácido chiquímico foi quantificado em discos foliares dos biótipos B1, B2 e B3, seguindo a metodologia descrita por Fernández-Escalada et al. (2016), utilizando oito repetições por tratamento. Três discos foliares com 4 mm de diâmetro foram coletados da folha mais jovem completamente expandida e submetidos à extração ácida. O teor de ácido chiquímico foi determinado por espectrofotometria utilizando leitor de microplacas (Synergy™ HT, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA), com leitura realizada a 380 nm. A quantificação foi realizada com base em uma curva padrão preparada a partir de concentrações conhecidas de ácido chiquímico (0–100 μg mL^{-1}). Os resultados foram expressos em μg de ácido chiquímico por disco foliar.

3.2.5 Extração de DNA

Tecido foliar (~100 mg) foi coletado dos biótipos resistentes B2 e B3 (n = 20) e do biótipo suscetível B1 (n = 15). As amostras foram coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas a −80 °C. O tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido, e aproximadamente 100 mg foram utilizados para a extração de DNA genômico (gDNA) utilizando o kit GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx, cat. nº E3595), seguindo as instruções do fabricante.

A concentração do DNA foi determinada utilizando um leitor de microplacas NanoPhotometer® NP80 (Implen GmbH, Munique, Alemanha), e sua integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%. O DNA genômico foi armazenado a −20 °C e utilizado para a quantificação do número de cópias do gene *EPSPS* e para o sequenciamento.

3.2.6 Determinação do número de cópias do gene *EPSPS*

O número de cópias do gene *EPSPS* foi estimado por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando DNA genômico dos biótipos B1 (suscetível, n = 15) e B2 e B3 (resistentes, n = 20). As reações foram realizadas utilizando o kit iQ SYBR Green Master Mix (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, EUA; ref. 170-8882), seguindo as recomendações do fabricante, com 12,5 ng de DNA genômico por reação e concentração final de primers de 0,3 µM.

Os primers utilizados para amplificação do gene *EPSPS* foram 5′-AGGTTCCATCAGCAGTCAATAC-3′ (forward) e 5′-TTTCGACATAGGGAATGGAGATTAG-3′ (reverse), gerando um amplicon de 113 pb. Para o gene de referência ACT (actina), foram utilizados os primers 5′-CTCTTCCAGCCATCCATGATT-3′ e 5′-CCTGATATCCACGTCACACTTC-3′, gerando um amplicon de 90 pb. Os primers foram desenhados utilizando a ferramenta PrimerQuest Tool (IDT), com base nas sequências dos genes EPSPS (KX108899.1) e ACT (PQ479510.1) de *D. insularis* disponíveis no NCBI. As condições de amplificação consistiram em desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 30 s e anelamento/extensão por 1 min a 62 °C (EPSPS) ou 60 °C (ACT). A análise da curva de dissociação confirmou a amplificação de um único produto específico.

Os valores de Ct foram utilizados para estimar o número relativo de cópias do gene *EPSPS* pelo método comparativo $2^{\wedge\text{-}\Delta\Delta Ct}$, em que $\Delta Ct = Ct^{ACT} - Ct^{EPSPS}$ (Livak e Schmittgen, 2003). Controles sem molde foram incluídos para detectar possíveis contaminações. A eficiência dos primers foi de 92,35% para EPSPS ($R^2 = 0,99$) e de 101% para ACT ($R^2 = 0,99$). Todas as reações foram realizadas em triplicata.

3.2.7 Sequenciamento do gene *EPSPS*

A amplificação por PCR foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de Premix Taq™ DNA Polymerase (Takara Bio Group, ref. R004A), 1,25 µL de cada primer forward e reverse (10 µM; concentração final de 0,5 µM), 6 µL de água livre de nucleases (Thermo Fisher Scientific, ref. 0581) e 40 ng de DNA genômico (4 µL por reação). Os primers utilizados para o sequenciamento do gene *EPSPS* foram

5′-AGCTGTAGTCGTTGGCTGTG-3′ e 5′-CCCAGCTATCAGAATGCTCTGC-3′ (Yannicari et al., 2022).

As condições da PCR consistiram em desnaturação inicial a 98 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos de amplificação (98 °C por 10 s, 58 °C por 30 s e 72 °C por 1 min), com extensão final a 72 °C por 2 min. O tamanho esperado do amplicon foi de 828 pb.

Os produtos de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1%. As amostras foram sequenciadas pelo método de Sanger utilizando o equipamento 3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific), pela empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal). As sequências obtidas foram analisadas e alinhadas utilizando os programas Chromas 2.6.6 e MEGA 11.0.13, empregando a sequência do gene *EPSPS* de *Digitaria sanguinalis* (GenBank: OM311259) como referência (Yannicari et al., 2022).

3.2.8 Análise estatística

Para as análises de concentração de ácido chiquímico e número de cópias do gene *EPSPS*, as médias foram calculadas utilizando plantas individuais como unidades experimentais. Os efeitos dos tratamentos dentro de cada biótipo foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). As análises estatísticas e a elaboração dos gráficos foram realizadas utilizando o software Origin (versão 2016; OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA).

3.3 Resultados

3.3.1 Fator de resistência ao glifosato

O biótipo suscetível B1 apresentou elevada sensibilidade ao glifosato, com redução acentuada do crescimento a partir de 360 g e.a. ha^{-1} e mortalidade na dose comercial de 1440 g e.a. ha^{-1}. Em contraste, os biótipos B2 e B3 apresentaram sobrevivência à dose comercial, mantendo indivíduos vivos até 2880 g e.a. ha^{-1} (Figura 3.1). Além da sobrevivência em doses mais elevadas, os biótipos resistentes apresentaram maior desenvolvimento vegetativo em comparação ao biótipo

suscetível. O aumento das doses de glifosato intensificou os sintomas de intoxicação, caracterizados principalmente por redução do crescimento, clorose e necrose foliar.

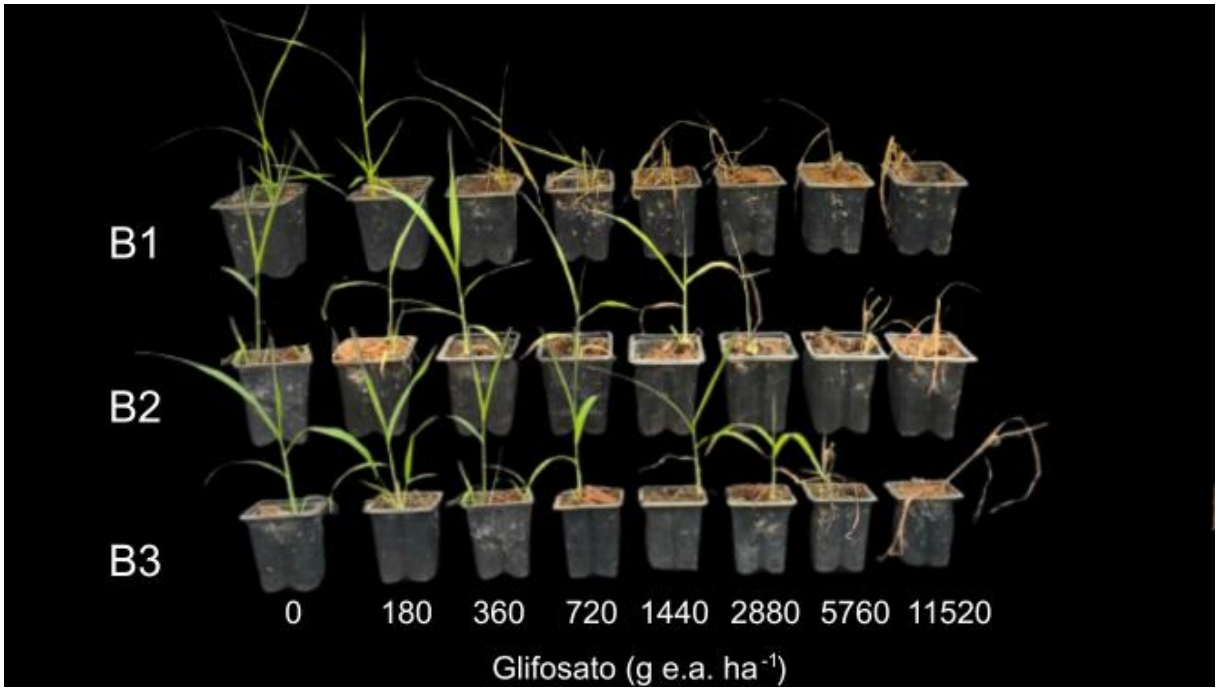


Figura 3.1. Resposta visual de biótipos de *Digitaria insularis* (B1, B2 e B3) submetidos a doses crescentes de glifosato (0, 360, 720, 1440, 2880, 5760 e 11520 g e.a. ha^{-1}) aos 21 dias após a aplicação.

O modelo log-logístico descreveu adequadamente a resposta dos biótipos de *D. insularis* ao glifosato, apresentando coeficientes de determinação (R^2) entre 0,98 e 0,99 (Tabela 3.1). Os valores de LD_{50} foram de 520 g e.a. ha^{-1} para B1, 980 g e.a. ha^{-1} para B2 e 1487 g e.a. ha^{-1} para B3, correspondendo a fatores de resistência de 1,9 e 2,9 para os biótipos resistentes (Figura 3.2a; Tabela 3.1). A dose recomendada em campo proporcionou controle completo do biótipo suscetível, enquanto o dobro dessa dose resultou em menos de 85% de controle dos biótipos B2 e B3. Para alcançar níveis superiores a 90% de controle, foram necessárias doses estimadas de 3658 e 8290 g e.a. ha^{-1} para B2 e B3, respectivamente. Os valores de LD_{90} foram de 1268, 3658 e 8290 g e.a. ha^{-1} para B1, B2 e B3, respectivamente (Tabela 3.1)

A massa seca da parte aérea diminuiu com o aumento das doses do herbicida. Os valores de GR_{50} foram de 418 g e.a. ha^{-1} para B1, 1263 g e.a. ha^{-1} para B2 e 1908 g e.a. ha^{-1} para B3, resultando em fatores de resistência de 3,0 e 4,6 para os biótipos

resistentes, respectivamente (Figura 3.2B; Tabela 3.1). Para GR_{90}, foram necessárias doses de 1250, 3748 e 9444 g e.a. ha⁻¹ para B1, B2 e B3, respectivamente.

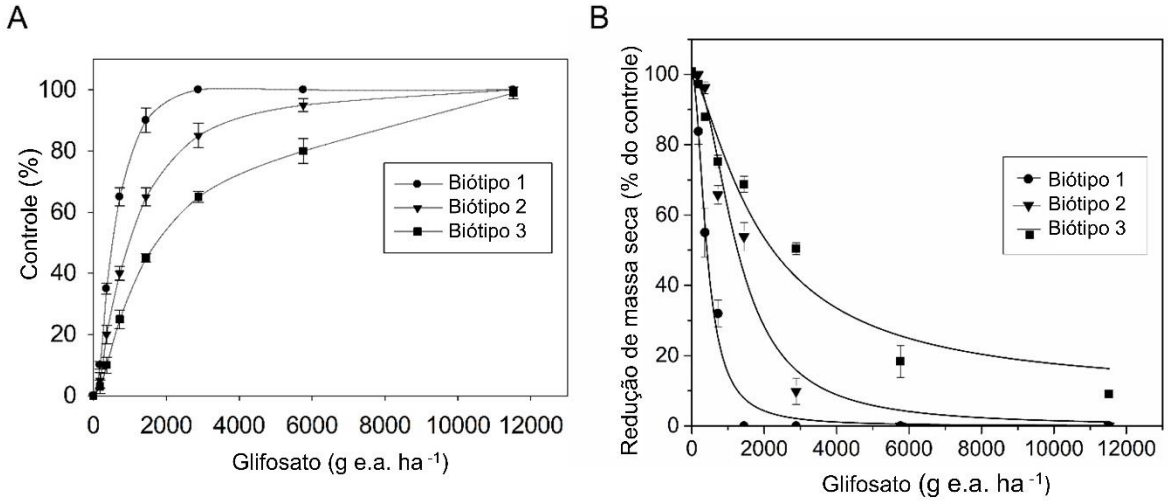


Figura 3.2. Curvas de dose-resposta de biótipos de *Digitaria insularis* ao glifosato. (A) controle visual (%) e (B) massa seca da parte aérea (% do controle) em função do aumento das doses de glifosato (0–11520 g e.a. ha⁻¹). Os pontos representam as médias observadas e as barras de erro representam o erro-padrão da média. As linhas representam o modelo log-logístico ajustado aos dados.

Tabela 3.1**.** Parâmetros do modelo dose–resposta estimados para o controle visual e a redução da massa seca da parte aérea de três biótipos (B1, B2 e B3) tratados com glifosato. LD_{50} e LD_{90} representam as doses necessárias para proporcionar 50% e 90% de controle visual, respectivamente, enquanto GR_{50} e GR_{90} correspondem às doses necessárias para reduzir a massa seca da parte aérea em 50% e 90%, respectivamente. FR = fator de resistência, calculado pela razão entre os valores de LD_{50} ou GR_{50} dos biótipos resistentes e do biótipo suscetível. R^2 = coeficiente de determinação. As doses são expressas em g e.a. ha⁻¹ (gramas de equivalente ácido por hectare).

Controle visual (%)					
Biótipo	Equação	LD_{50} g e.a. ha^{-1}	FR	LD_{90} g e.a. ha^{-1}	R^2
B1	$y = 100/[1+(x/520)^{2,8}]$	520	-----	1365	0,99
B2	$y = 100 / [1+(x/980)^{1,67}]$	980	1,9	3658	0,99
B3	$y = 100/[1+(x/1487)^{1,28}]$	1487	2,9	8290	0,99
Redução da massa seca (% do controle)					
Biótipo	Equação	GR_{50} g e.a. ha^{-1}	FR	GR_{90} g e.a. ha^{-1}	R^2
B1	$y = 100 / [1+(x/418)^{1,98}]$	418	-----	1268	0,99
B2	$y = 100 / [1+(x/1263)^{2,02}]$	1263	3,0	3747	0,99
B3	$y = 100 / [1+(x/1487)^{1,37}]$	1487	4,6	9444	0,98

3.3.2 Resposta do acúmulo de ácido chiquímico ao glifosato

O acúmulo de ácido chiquímico diferiu entre os biótipos aos 7 dias após a aplicação (DAA) do glifosato. O biótipo B1 apresentou aumento médio de aproximadamente 4 e 16 µg disco^{-1} nas doses de 1× e 3× a dose recomendada, respectivamente, em comparação à testemunha, que apresentou cerca de 1 µg disco^{-1}. No biótipo B2, os teores de ácido chiquímico não diferiram entre a testemunha e a dose de 1× (<1 µg disco^{-1}), mas aumentaram para aproximadamente 3 µg disco^{-1} na dose de 3×. Já o biótipo B3 não apresentou incremento no acúmulo de ácido chiquímico, mantendo valores entre 0,8 e 2 µg disco^{-1} em todos os tratamentos com glifosato (Figura 3.3).

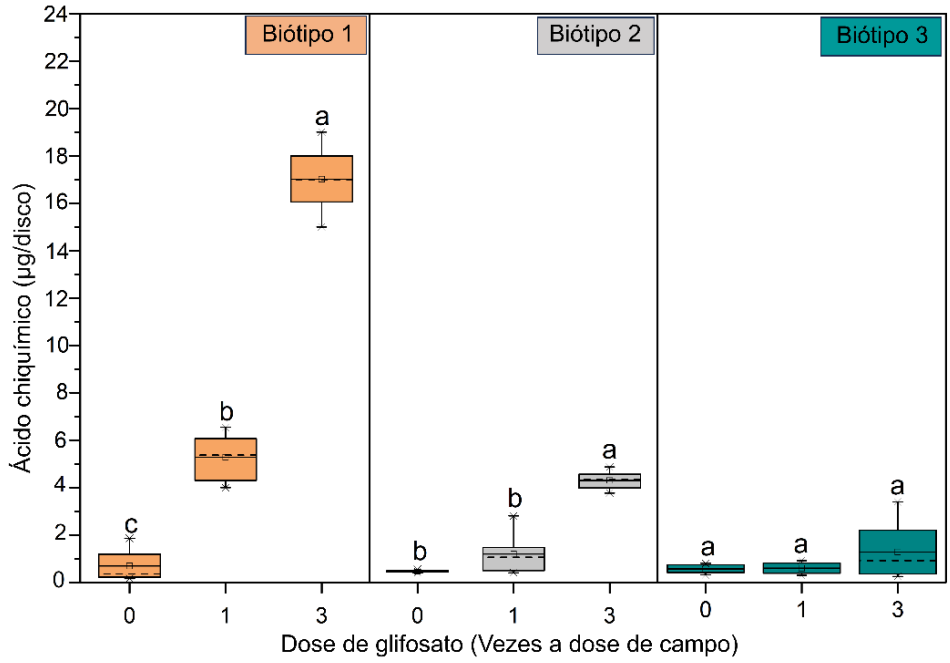


Figura 3.3. Acúmulo de ácido chiquímico (µg disco^{-1}) nas folhas do biótipo suscetível (B1) e dos biótipos resistentes (B2 e B3) de *Digitaria insularis*, avaliado aos 7 dias após a aplicação de glifosato em função da dose do herbicida [0, 1× (dose recomendada = 1440 g e.a. ha^{-1}) e 3× a dose recomendada em campo]. As caixas representam o intervalo interquartílico (Q1–Q3), a linha tracejada indica a mediana, a linha contínua indica a média e os bigodes representam os valores mínimo e máximo (n = 8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as doses dentro de cada biótipo (teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

3.3.3. Número de cópias do gene *EPSPS*

A quantificação do número relativo de cópias do gene *EPSPS* diferiu entre os biótipos resistentes e o biótipo suscetível (B1). Os valores médios indicaram aumento aproximado de 20% no biótipo B2 e de 40% no biótipo B3 em relação ao B1 (Figura 3.4.A). O número relativo de cópias de *EPSPS* variou de 0,90 a 0,95 no biótipo B1 (n= 15), de 1,0 a 1,2 no biótipo B2 (n = 20) e de 1 a 2,2 no biótipo B3 (n= 20). Os valores individuais indicaram alta variabilidade entre indivíduos de um mesmo biótipo, principalmente no B3 (Figura 3.4.B).

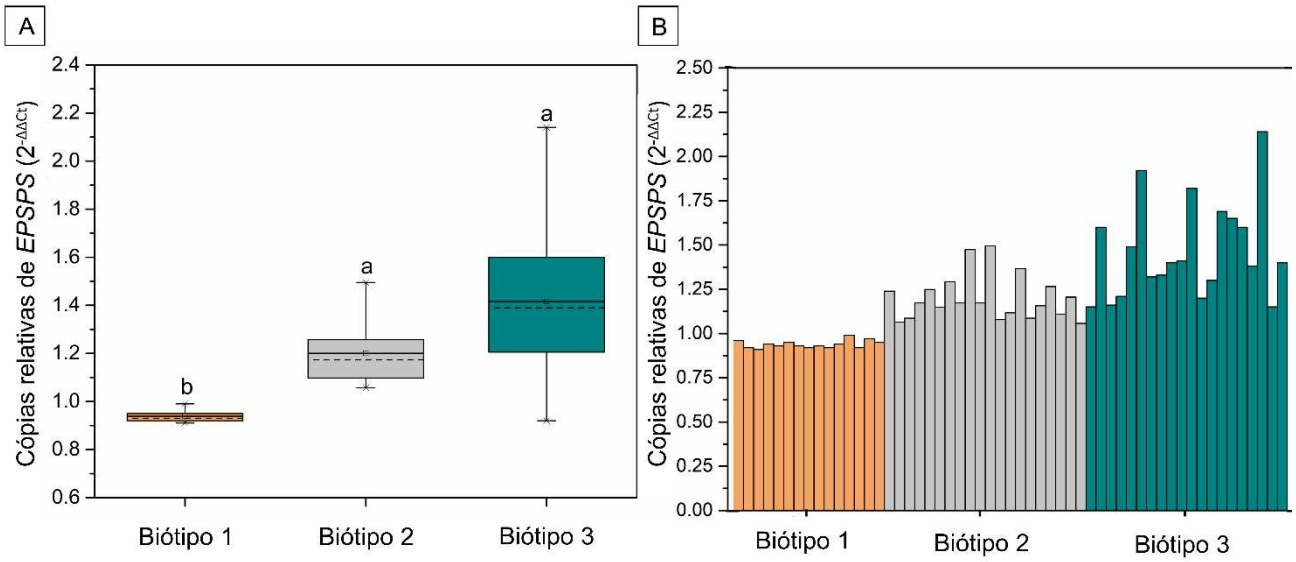


Figura 3.4. Número relativo de cópias do gene *EPSPS* em biótipos de *Digitaria insularis.* (A) Boxplot representando a distribuição dos valores do número relativo de cópias do gene *EPSPS* nos biótipos. As caixas representam o intervalo interquartil (Q1–Q3), a linha tracejada indica a mediana, a linha contínua a média e os bigodes correspondem aos valores mínimo e máximo. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre biótipos (Tukey, $p \leq 0,05$). (B) Valores individuais do número relativo de cópias do gene *EPSPS*. expressos como $2^{-\Delta\Delta Ct}$, para cada amostra analisada. A quantificação utilizou o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, com normalização pelo gene de referência actina. B1: n = 15; B2: n = 20; B3: n = 20.

3.3.4 Mutação no gene *EPSPS*

A análise dos cromatogramas do gene *EPSPS* revelou variação entre o biótipo suscetível (B1) e os biótipos resistentes ao glifosato (B2 e B3). Todos os biótipos apresentaram uma substituição sinônima na posição 102 (ACT para ACG) em comparação com a sequência de referência (*Digitaria sanguinalis*), sem alteração no aminoácido codificado (Thr102Thr). A posição 103 foi totalmente conservada em todos os biótipos. Na posição 106, B1 apresentou uma substituição sinônima, mantendo prolina (Pro106Pro), enquanto B2 e B3 apresentaram uma substituição missense não sinônima, resultando na mudança de prolina para treonina (Pro106Thr), detectada em 100% dos indivíduos analisados (Figura 3.5).

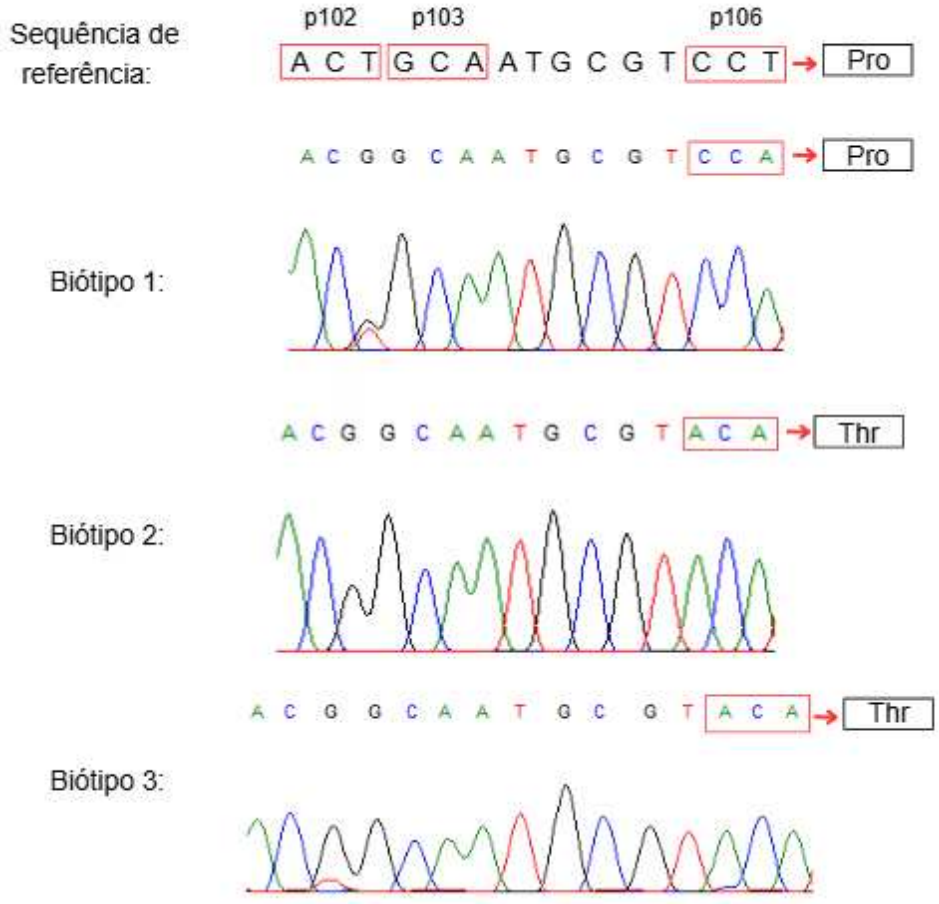


Figura 3.5. Os cromatogramas do sequenciamento do fragmento do gene *EPSPS* em biótipo suscetível (B1) e biótipos resistentes (B2 e B3) de *Digitaria insularis* indicam as posições dos códons 102, 103 e 106, definidas com base na sequência de referência de *Digitaria sanguinalis* (GenBank: OM311259) (Yanniccari et al., 2022).

3.4 Discussão

Os biótipos B2 e B3 apresentaram FR de 1,9 e 2,9 com base na C_{50} e de 3,0, 4,6 relacionado GR_{50}, respectivamente. O FR indica quantas vezes a dose de glifosato necessária para promover 50% de controle e reduzir a massa seca é maior nos biótipos resistentes em comparação ao biótipo suscetível (Avila et al., 2005), confirmando a resistência a glifosato dos biotipos resistentes, com destaque para o B3. Os estudos relatam ampla variação no FR em *D. insularis*, com valores entre 2,7

e 26,7 (Moisinho et al., 2024; Silveira et al., 2018). As comparações entre estudos devem ser interpretadas com cautela, pois o FR depende da suscetibilidade do biótipo suscetível ao herbicida, assim como das condições experimentais. Os valores de C_{50} para biótipos suscetíveis variam consideravelmente na literatura, de 100 g e.a. ha^{-1} (Reinet et al., 2013) a 431 g e.a. ha^{-1} (Silveira et al., 2018). Essa variação nos valores de C_{50} evidencia a limitação do FR como único critério de comparação entre estudos.

Comparações baseadas na dose necessária para alcançar altos níveis de controle (>90%), considerando o mesmo estádio de desenvolvimento das plantas, constituem uma abordagem mais robusta para avaliar a sensibilidade entre diferentes estudos. A LD_{90} foi 2,5 e 5,8 vezes superior à dose comercial recomendada de glifosato para os biótipos B2 e B3, respectivamente. Esses resultados indicam que a aplicação isolada de glifosato não é uma estratégia sustentável para o manejo desses biótipos. Embora o glifosato permaneça altamente eficaz no controle de outras espécies presentes na área, sua aplicação repetida mantém as populações de *Digitaria insularis* sob contínua pressão de seleção, favorecendo a sobrevivência e a proliferação de biótipos resistentes no campo (Takano et al., 2019).

Os biótipos B2 e B3 foram coletados em lavoura de café, um sistema no qual, apesar do uso contínuo de glifosato, a pressão de seleção é geralmente menor do que em culturas anuais transgênicas, como soja e milho resistentes ao glifosato. Essa menor pressão está associada à menor frequência de aplicações, ao uso de aplicações dirigidas e ao manejo menos intensivo característico de sistemas perenes (Fontes et al., 2022). Esse fator explica, em parte, por que os níveis de resistência desses biótipos são inferiores aos relatados em sistemas agrícolas mais intensivos. Estudos anteriores demonstraram que a intensidade e a frequência do manejo químico exercem papel mais importante na seleção da resistência do que a simples dispersão de propágulos entre áreas agrícolas (Cavalieri et al., 2021).

O acúmulo de ácido chiquímico reforça ainda mais essa distinção entre os biótipos. O teor de chiquimato é um marcador amplamente reconhecido, pois se acumula quando a enzima EPSPS é inibida pelo glifosato, podendo ser utilizado para diferenciar plantas resistentes e suscetíveis (Koger et al., 2005). Em plantas suscetíveis, essa inibição leva ao acúmulo de ácido chiquímico, enquanto, em biótipos resistentes, a redução ou ausência da inibição da EPSPS impede esse acúmulo nas doses recomendadas de glifosato (Gaines et al., 2010; Zulet-González et al., 2020;

Martinelli et al., 2022). O maior acúmulo de chiquimato observado na população B2 e a ausência de acúmulo na população B3 correlacionaram-se com os níveis de resistência obtidos nas curvas de dose-resposta, indicando maior resistência em B3 em comparação com B2.

Os biótipos resistentes de *D. insularis* apresentaram aumento no número de cópias do gene *EPSPS* (~20% em B2 e ~40% em B3) em relação ao biótipo suscetível. Embora esse aumento esteja associado à resistência ao glifosato em outras espécies, como *Amaranthus palmeri* e *Bassia scoparia*, entre outras (Gaines et al., 2011; Sammons et al., 2014; Wiersma et al., 2015; Gaines et al., 2016; Patterson et al., 2018), ainda não há relatos na literatura demonstrando que esse mecanismo confira resistência em *D. insularis*.

Estudos sugerem que a resistência em biótipos dessa espécie pode envolver múltiplos mecanismos, incluindo redução da absorção, diminuição da translocação e aumento do metabolismo do herbicida (de Carvalho et al., 2012), além de mutações no sítio de ação e outros mecanismos que ainda não foram completamente elucidados (Galeano et al., 2016; Gazola et al., 2016; Melo et al., 2019). Essa diversidade de mecanismos está associada à elevada variabilidade genética da espécie, característica de plantas alógamas (Martins et al., 2016; Amaral et al., 2023), bem como à seleção independente de populações resistentes em diferentes regiões agrícolas (Takano et al., 2019). Portanto, a identificação dos mecanismos de resistência em biótipos provenientes de diferentes regiões ou sistemas de cultivo é essencial para definir a estratégia de manejo local mais eficaz.

A amplificação gênica pode conferir elevados níveis de resistência mesmo na ausência de mutações no sítio de ação, como demonstrado em *Amaranthus palmeri*, no qual a expressão da EPSPS pode aumentar em até 35 vezes e o número de cópias do gene variar de 5 a 160 (Gaines et al., 2010). No entanto, o nível de resistência conferido por esse mecanismo depende da magnitude da amplificação gênica, de modo que aumentos modestos no número de cópias não resultam necessariamente em altos níveis de resistência, evidenciando seu caráter quantitativo (Gaines et al., 2019). No presente estudo, o aumento relativamente modesto no número de cópias da EPSPS sugere uma contribuição limitada para a resistência, indicando um papel secundário desse mecanismo. Ainda assim, a diferença observada entre B2 e B3 (1,2

versus 1,4 cópias) pode, ao menos em parte, explicar a variação nos níveis de resistência.

A mutação Pro-106-Thr no gene *EPSPS* foi identificada nos biótipos resistentes de *Digitaria insularis*. Essa substituição no códon 106 representa o mecanismo de resistência ao glifosato mais amplamente relatado em espécies de plantas daninhas e é considerada a mutação mais comum associada à resistência a esse herbicida em todo o mundo (Heap, 2024). Quando presente de forma isolada, a substituição Pro-106 geralmente confere baixos a moderados níveis de resistência, normalmente inferiores a dez vezes, o que ainda pode ser suficiente para garantir a sobrevivência das plantas sob a dose recomendada de glifosato (Morran et al., 2018).

Em nível estrutural, as substituições nessa posição promovem um leve estreitamento da cavidade de ligação tanto para o glifosato quanto para o fosfoenolpiruvato (PEP), reduzindo a afinidade do herbicida pela enzima sem comprometer significativamente sua atividade catalítica. Esse ajuste estrutural sutil ajuda a explicar por que os biótipos resistentes mantêm sua viabilidade mesmo na presença de glifosato (Takano et al., 2018).

A resistência ao glifosato frequentemente envolve a combinação de múltiplos mecanismos dentro do mesmo biótipo. Sob pressão contínua de seleção, mecanismos de resistência por alteração no sítio de ação (TSR + TSR) ou a combinação de mecanismos de alteração no sítio de ação e mecanismos não relacionados ao sítio de ação (TSR + NTSR) podem se acumular e atuar de forma sinérgica, resultando em níveis de resistência superiores aos observados quando esses mecanismos atuam isoladamente (Alcántara-de La Cruz et al., 2026).

Esse padrão foi relatado em *Eleusine indica* provenientes do México e da China, em *Amaranthus palmeri* da Argentina e em *Poa annua* dos Estados Unidos, envolvendo a combinação da amplificação ou superexpressão do gene *EPSPS* com mutações Pro-106 (Brunharo et al., 2019; Chen et al., 2020; Gherekhloo et al., 2017; Kaundun et al., 2019; Zhang et al., 2025). De forma semelhante, em *Amaranthus hybridus* do Brasil, a mutação tripla TAP-IVS ocorre em conjunto com a amplificação da EPSPS (Resende et al., 2025; Sulzbach et al., 2024).

Da mesma forma, em *Conyza canadensis*, a avaliação isolada dos mecanismos TSR e NTSR resultou em níveis de resistência substancialmente menores (sete e nove vezes, respectivamente) do que aqueles observados quando ambos os

mecanismos estavam combinados (45 vezes), evidenciando o efeito sinérgico entre os mecanismos de resistência (Page et al., 2025).

A diferença nos níveis de resistência entre os biótipos B3 e B2 de *Digitaria insularis* é mais bem explicada pela interação entre dois mecanismos de resistência por alteração no sítio de ação (TSR + TSR), envolvendo a amplificação do gene *EPSPS* e a mutação Pro-106**.** Esses resultados sugerem que o número ligeiramente maior de cópias do gene *EPSPS* contribuiu de forma sinérgica para o aumento do fenótipo de resistência. Por outro lado, embora não tenham sido avaliados neste estudo, não se pode descartar a possível contribuição de mecanismos de resistência não relacionados ao sítio de ação (NTSR), como redução da absorção, diminuição da translocação ou aumento do metabolismo do herbicida. Assim, uma caracterização mais abrangente dos mecanismos de resistência é necessária para compreender plenamente a resistência ao glifosato nesses biótipos.

3.5 Conclusão

Os biótipos de *insularis* coletados em uma lavoura de café apresentaram sensibilidade reduzida ao glifosato. A mutação Pro106Thr no sítio de ação da enzima EPSPS foi o principal mecanismo responsável pela resistência. Os níveis relativamente baixos de resistência permitem a sobrevivência das plantas à dose comercial de glifosato e indicam que o uso isolado desse herbicida não constitui uma estratégia sustentável para o manejo desses biótipos.

Além disso, a detecção da amplificação do gene *EPSPS*, embora com contribuição modesta para a resistência, sugere que esse mecanismo de resistência por alteração no sítio de ação (TSR) pode estar emergindo em *D. insularis* e tornar-se mais relevante à medida que a pressão de seleção se intensifique. Esses resultados reforçam a importância do monitoramento precoce da resistência e da adoção de estratégias de manejo integrado, como a rotação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação e práticas não químicas, incluindo o cultivo consorciado, para retardar a evolução da resistência e preservar a eficácia do glifosato em sistemas de produção de café.

3.6. Referências bibliográficas

Alcántara-de la Cruz, R.; Guidi, Y. M.; Ramírez-Castillo, M.; Adegas, F. S.; Carbonari, C. A.; Velini, E. D.; De Prado, R.; Duke, S. O. Thirty Years of Glyphosate-Resistant Crops and Weeds: Current Situation and Future Prospects. **Pest Management Science**, v. 75, p. 1663-1670, 2026. https://doi.org/10.1002/ps.70742.

Almeida, A. M.; Marchiosi, R.; Abrahão, J.; Constantin, R. P.; dos Santos; W. D.; Ferrarese-Filho, O. Revisiting the shikimate pathway and highlighting their enzyme inhibitors. **Phytochemistry Reviews**, v. 23, p. 421-457, 2024. https://doi.org/10.1007/s11101-023-09889-6.

Amaral, G. S.; Silveira, H. M.; Mendes, K. F.; Silva, A. J.; Silva, M. F.; Carbonari, C. A., & la Cruz, R. A. D. Herbicide resistance status of sourgrass. **Advances in Weed Science**, v. 41, p. e020230028, 2023. https://doi.org/10.51694/AdvWeedSci/2023;41:00024.

Avila, L. A.; Lee, D. J.; Senseman, S. A.; McCauley, G. N.; Chandler, J. M.; & Cothren, J. T. Assessment of acetolactate synthase (ALS) tolerance to imazethapyr in red rice ecotypes (*Oryza* spp) and imidazolinone tolerant/resistant rice (*Oryza sativa*) varieties. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 61, p. 171-178, 2005. 10.1002/ps.966.

Brunharo, C. A. D. C. G.; Morran, S.; Martin, K.; Moretti, M. L.; & Hanson, B. D. EPSPS duplication and mutation involved in glyphosate resistance in the allotetraploid weed species *Poa annua* L. **Pest management science**, v. 75, p. 1663-1670, 2019. https://doi.org/10.1002/ps.5284.

Brunharo, C. A. D. C. G.; Morran, S.; Martin, K.; Moretti, M. L.; & Hanson, B. D. EPSPS duplication and mutation involved in glyphosate resistance in the allotetraploid weed species *Poa annua* L. **Pest management science**, v. 75, p. 1663-1670, 2019. https://doi.org/10.1002/ps.5284.

Carvalho, L. B.; Alves, P. L. C. A.; & Bianco, S. Densidades de capim-amargoso afetando o crescimento inicial e o teor de macronutrientes do cafeeiro. **Planta Daninha**, v. 31, p. 109-115, 2013. https://doi.org/10.1590/S0100-83582013000100012.

Cavalieri, J. D.; Nascentes, R. F.; Negrisoli, M. M.; Carbonari, C. A.; & Raetano, C. G. Sensitivity and resistance level of sourgrass population subjected to glyphosate application. **Journal of Plant Protection Research**, v. 1, p. 61, 2021. https://doi.org/10.24425/jppr.2021.136267.

Chen, J.; Huang, H.; Wei, S.; Cui, H.; Li, X.; & Zhang, C. Glyphosate resistance in *Eleusine indica*: EPSPS overexpression and P106A mutation evolved in the same individuals. **Pesticide biochemistry and Physiology**, v. 164, p. 203-208, 2020. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.01.014.

De Carvalho, L. B.; Alves, P. L.; 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 of Agricultural and Food Chemistry***,* v. 60, p. 615-622, 2012. https://doi.org/10.1021/jf204089d.

Fontes, Daniel R.; Ribeiro, Andrew de Paula; Reis, Marcelo Rodrigues dos; Inoue, Miriam Hiroko; Mendes, Kassio Ferreira. Integrated weed management in coffee for sustainable agriculture: a practical Brazilian approach. In: **Hasanuzzaman, Mirza (org.).** *New insights in herbicide science*. Londres: **IntechOpen**, 2022.

Gaines, T. A.; Patterson, E. L.; Neve, P. Molecular mechanisms of adaptive evolution revealed by global selection for glyphosate resistance**. New Phytol**. v. 223, p.1770-1775, 2019. 10.1111/nph.15858.

Gaines, T. A.; Barker, A. L.; Patterson, E. L.; Westra, P.; Westra, E. P.; Wilson, R. G.; ... & Kniss, A. R. EPSPS gene copy number and whole-plant glyphosate resistance

level in *Kochia scoparia*. **PLoS One**, v. 11, p. e0168295, 2016. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168295.

Gaines, T. A.; Shaner, D. L.; Ward, S. M.; Leach, J. E.; Preston, C.; & Westra, P. Mechanism of resistance of evolved glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5886-5889, 2011. https://doi.org/10.1021/jf104719k.

Gaines, T. A.; Zhang, W.; Wang, D.; Bukun, B.; Chisholm, S. T.; Shaner, D. L.; ... & Westra, P. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 1029-1034, 2010. https://doi.org/10.1073/pnas.0906649107.

Galeano, E.; Barroso, A. A. M.; Vasconcelos, T. S.; López-Rubio, A.; Albrecht, A. J. P.; Victoria Filho, R., & Carrer, H. EPSPS variability, gene expression, and enzymatic activity in glyphosate-resistant biotypes of *Digitaria insularis*. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, p. e0168295, 2016. 10.4238/gmr.15038730.

Galon, L.; Schmitz, M. H.; Henz Neto, O. D.; Müller, C.; Cavaletti, D. C.; Giacomini, J. P.; ... & Perin, G. F. Morphophysiological and nutritional responses in maize hybrids competing with *Digitaria insularis*. **Revista Caatinga**, v. 38, p. e11821, 2024. https://doi.org/10.1590/1983-21252025v3811821rc.

Gazola, T.; Belapart, D.; Castro, E. D.; Cipola Filho, M. L.; & Dias; M. F. Biological characteristics of *Digitaria insularis* that confer its resistance to herbicides and management options. **Científica**, v. 44, p. 557-567, 2016. https://doi.org/10.15361/1984- 5529.2016v44n4p557-567.

Gherekhloo, J.; Fernández-Moreno, P. T.; Alcántara-de la Cruz, R.; Sánchez-González, E.; Cruz-Hipolito, H. E.; Domínguez-Valenzuela, J. A.; & De Prado, R. Pro-106-Ser mutation and EPSPS overexpression acting together simultaneously in glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica*). **Scientific Reports**, v. 7, p. 6702, 2017. https://doi.org/10.1038/s41598-017-06772-1.

HEAP, I. *The International Survey of Herbicide Resistant Weeds*. 2024. Available at: http://www.weedscience.org. Accessed on: May 3, 2026.

Kaundun, S. S.; Jackson, L. V.; Hutchings, S. J.; Galloway, J.; Marchegiani, E.; Howell, A.; ... & Moreno, R. Evolution of target-site resistance to glyphosate in an *Amaranthus palmeri* population from Argentina and its expression at different plant growth temperatures. **Plants**, v. 8, p. 512, 2019. https://doi.org/10.3390/plants8110512.

Koger, C. H.; Shaner, D. L.; Henry, W. B.; Nadler-Hassar, T.; Thomas, W. E.; & Wilcut, J. W. Assessment of two nondestructive assays for detecting glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). **Weed science**, v. 53, p. 559-566, 2005. https://doi.org/10.1614/WS-05-010R.1.

Livak, K. J.; & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **methods**, v. 25, p. 402-408, 2001. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262.

Martinelli, R.; Rufino Jr, L. R.; de Melo, A. C.; Alcantara-de La Cruz, R.; da Silva, J. R.; Boaretto, R. M.; de Azevedo, F. A. Glyphosate excessive use chronically disrupts the shikimate pathway and can affect photosynthesis and yield in citrus trees. **Chemosphere**, v. 308, p. 136468, 2022. 10.1016/j.chemosphere.2022.136468.

Martins, J. F.; Barroso, A. A. M.; Carvalho, L. B.; Cesarin, A. E.; Amaral, L. C.; Nepomuceno, M. P. Plant growth and genetic polymorphism in glyphosate-resistant sourgrass (*Digitaria insularis* L. Fedde). **Australian Journal of Crop Science**, v. 10, p. 1466-1473, 2016. https://doi.org/10.21475/ ajcs.2016.10.10p7761.

Melo, M. S. C.; Rocha, L. J. F. N.; Brunharo, C. A. C. G.; Nicolai, M.; Tornisiello, V. L.; Nissen, S. J.; & Christoffoleti, P. J. Sourgrass resistance mechanism to the herbicide glyphosate. **Planta Daninha**, v. 37, p. e019185746, 2019. https://doi.org/10.1590/S0100-83582019370100033.

Miranda, G. R. B.; Bregagnoli, M.; & Dias, R. A. P**.** A scale of grades for evaluation of herbicide weed control efficiency. **Revista Agrogeoambiental**, v. 13, 2021. 10.18406/2316-1817v13n320211621.

Moisinho, I. S.; Ferreira, L. A. I.; Krzyzaniak, F.; Albrecht, A. J. P.; Albrecht, L. P.; & Brunharo, C. Multiple-resistance evolution to ACCase inhibitors and glyphosate in sourgrass (*Digitaria insularis*) is attributed to diverse polymorphisms in the herbicide target sites. **Weed Science**, v. 72, p. 517-526, 2024. https://doi.org/10.1017/wsc.2024.53.

Morran, S.; Moretti, M. L.; Brunharo, C. A.; Fischer, A. J.; & Hanson, B. D. Multiple target site resistance to glyphosate in junglerice (*Echinochloa colona*) lines from California orchards. **Pest management science**, v. 74, p. 2747-2753, 2018. https://doi.org/10.1002/ps.5061.

Onofre, L. C.; Onofre, T. B.; & Rezende, T. T. Control of *Digitaria insularis* resistant to glyphosate using a combination of herbicides in coffee farms. **Coffee Science**, v. 16, p. e161876, 2021. https://doi.org/10.25186/.v16i.1876.

Page, E. R.; Martin, S. L.; Meloche, S.; Thibodeau, A.; & Laforest, M. Functional synergy and genomic linkage of glyphosate resistance traits in Canada fleabane. **Pest Management Science**, v. 82, p. 305-318, 2026. https://doi.org/10.1002/ps.70194.

Pagnoncelli Jr, F. D. B.; Losada, F. B.; Alvear, M. J. G.; Gonzalez-Andujar, J. L.; Trezzi, M. M.; Bittencourt, H. V. H.; & Salomão, H. M. Response characterization and target site mechanism study in glyphosate-resistant populations of *Lolium multiflorum* L. from Brazil. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 198, p. 105737, 2024. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105737.

Patterson, E. L.; Pettinga, D. J.; Ravet, K.; Neve, P.; & Gaines. Glyphosate resistance and EPSPS gene duplication: convergent evolution in multiple plant species. **Journal of Heredity**, v. 109, p. 117-125, 2018. https://doi.org/10.1093/jhered/esx087.

Reinert, C. S.; Prado, A. B. C. A.; Christoffoleti P.J. Comparative dose-response curves between sourgrass (*Digitaria insularis*) resistant and susceptible biotypes to glyphosate. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 12, p. 260–267, 2013. https://doi.org/10.7824/rbh.v12i3.223.

Resende, L. S.; Dos Reis, G. L.; Netto, A. G.; Borsato, E. F.; Penckowski, L. H.; Alvarenga, J. P.; ... & Chalfun-Junior, A. Alterations in EPSPS enzyme active site: Changes in position and reduced interaction energy contributing to glyphosate resistance in *Amaranthus hybridus*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 227, p. 110164, 2025. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2025.110164.

Riechers, D. E.; Soltani, N.; Chauhan, B. S.; Concepcion, J. C. T.; Geddes, C. M.; Jugulam, M.; ... & Sikkema, P. H. Herbicide resistance is complex: a global review of cross-resistance in weeds within herbicide groups. **Weed Science**, v. 72, p. 465-486, 2024. https://doi.org/10.1017/wsc.2024.33.

Sammons, R. D.; & Gaines, T. A. Glyphosate resistance: state of knowledge. **Pest management science**, v. 70, p. 1367-1377, 2014. https://doi.org/10.1002/ps.3743.

Silveira, H. M. D.; Langaro, A. C.; Cruz, R. A. D. L.; Sediyama, T.; & Silva, A. A. D. Glyphosate efficacy on sourgrass biotypes with suspected resistance collected in GR-crop fields. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 40, p. e35120, 2018. https://doi.org/10.4025/actasciagron.v40i1.35120.

Simard, M. J.; & Laforest, M. Early detection and management of herbicide-resistant weeds. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 104, p. 533-539, 2024. 10.1139/cjps-2024-0021.

Souza, A. P. D.; Alves, J. F.; Inokuti, E. M.; Garcia, F.; Ferreira, B. W.; Nobrega, T. F. D.; ... & Moreira, C. C. Anthracocystis panici-leucophaei: A Potential Biological Control Agent for the Grassy Weed *Digitaria insularis*. **Agronomy**, v. 14, p. 2926, 2024. https://doi.org/10.3390/agronomy14122926.

Sulzbach, E.; Turra, G. M.; Cutti, L.; Kroth, L. V. E.; Tranel, P. J.; Merotto Jr, A.; & Markus, C. Smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*) and unresolved *Amaranthus* spp. from Brazil resistant to glyphosate exhibit the EPSPS TAP-IVS substitution. **Weed Science**, v. 72, p. 48-58, 2024. 10.1017/wsc.2023.70.

Takano, H. K.; de Oliveira Jr, R. S.; Constantin, J.; Mangolim, C. A.; Machado, M. D. F.; & Bevilaqua, M. R. Spread of glyphosate-resistant sourgrass (*Digitaria insularis*): Independent selections or merely propagule dissemination? **Weed Biology and Management**, v. 18, p. 50-59, 2018. https://doi.org/10.1111/wbm.12143.

Takano, H. K.; Mendes, R. R.; Scoz, L. B.; Ovejero, R. F. L.; Constantin, J.; Gaines, T. A.; ... & Oliveira Jr, R. S. Proline-106 EPSPS mutation imparting glyphosate resistance in goosegrass (*Eleusine indica*) emerges in South America. **Weed Science**, v. 67, p. 48-56, 2019. https://doi.org/10.1017/wsc.2018.71.

Wiersma, A. T.; Gaines, T. A.; Preston, C.; Hamilton, J. P.; Giacomini, D.; Robin Buell, C.; ... & Westra, P. Gene amplification of 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase in glyphosate-resistant *Kochia scoparia*. **Planta**, v. 241, p. 463-474, 2015. https://doi.org/10.1007/s00425-014-2197-9.

Yanniccari, M.; Vázquez-García, J. G.; Gigón, R.; Palma-Bautista, C.; Vila-Aiub, M., & De Prado, R. A novel EPSPS Pro-106-His mutation confers the first case of glyphosate resistance in *Digitaria sanguinalis*. **Pest Management Science**, v. 78, p. 3135-3143, 2022. https://doi.org/10.1002/ps.6940.

Zhang, C.; Yu, C. J.; Yu, Q.; Guo, W. L.; Zhang, T. J.; & Tian, X. S. Evolution of multiple target-site resistance mechanisms in individual plants of glyphosate-resistant *Eleusine indica* from China. **Pest management science**, v. 77, p. 4810-4817, 2021. https://doi.org/10.1002/ps.6527.

Zulet-González, A.; Barco-Antoñanzas, M.; Gil-Monreal, M.; Royuela, M.; & Zabalza, A. Increased glyphosate-induced gene expression in the shikimate pathway is

abolished in the presence of aromatic amino acids and mimicked by shikimate. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 459, 2020. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00459.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação das espécies do gênero *Commelina* é fundamental para a definição de estratégias de controle químico, uma vez que a eficácia dos herbicidas variou entre as espécies avaliadas. Entre os tratamentos, o triclopir apresentou o desempenho mais consistente, com elevada eficiência de controle nas três espécies. Além disso, herbicidas pertencentes ao mesmo mecanismo de ação apresentaram respostas distintas, como observado entre os inibidores da PROTOX, demonstrando que características específicas das moléculas, como sua mobilidade na planta, influenciam a eficácia do controle. A ocorrência de interações aditivas, sinérgicas e antagônicas sugere que a escolha de misturas deve ser baseada em resultados experimentais, e não apenas na combinação de diferentes mecanismos de ação.

As avaliações bioquímicas e anatômicas demonstraram que a tolerância ao glifosato em *Commelina benghalensis* e *C. diffusa* não impede a ocorrência de alterações fisiológicas induzidas pelo herbicida. O acúmulo de ácido chiquímico, as alterações nos compostos fenólicos e as modificações anatômicas observadas ampliam o conhecimento sobre os efeitos do glifosato em espécies tolerantes e fornecem informações que poderão subsidiar futuras investigações sobre os processos envolvidos nessa característica.

A identificação da mutação Pro106Thr associada à amplificação do gene *EPSPS* em populações de *Digitaria insularis* provenientes da Zona da Mata Mineira confirma a ocorrência de múltiplos mecanismos de resistência relacionados ao sítio de ação do glifosato. Esses resultados reforçam a importância do monitoramento contínuo das populações resistentes e evidenciam que estudos futuros devem priorizar a implementação e a validação de estratégias integradas de manejo, envolvendo a diversificação de mecanismos de ação, a integração de métodos de controle e a redução da pressão de seleção, visando retardar a evolução da resistência e prolongar a vida útil dos herbicidas.