

**TIAGO GAZOLA**

**AÇÃO DO HERBICIDA GLYPHOSATE EM BIÓTIPOS DE *Digitaria insularis*  
RESISTENTES E SUSCETÍVEIS**

**Botucatu**

**2017**



**TIAGO GAZOLA**

**AÇÃO DO HERBICIDA GLYPHOSATE EM BIÓTIPOS DE *Digitaria insularis*  
RESISTENTES E SUSCETÍVEIS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini  
Coorientador: Prof. Dr. Caio Antônio Carbonari

**Botucatu**

**2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

G291a      Gazola, Tiago, 1987-  
Ação do herbicida glyphosate em biótipos de *Digitaria insularis* resistentes e suscetíveis / Tiago Gazola.  
- Botucatu : [s.n.], 2017  
85 f. : fots. color., grafs. color., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2017  
Orientador: Edivaldo Domingues Velini  
Coorientador: Caio Antônio Carbonari  
Inclui bibliografia

1. Herbicidas. 2. Plantas - Efeito do glifosato. 3. Erva daninha - Controle. I. Velini, Edivaldo Domingues. II. Carbonari, Caio Antônio. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte."



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO: AÇÃO DO HERBICIDA GLYPHOSATE EM BIÓTIPOS DE *Digitaria insularis* RESISTENTES E SUSCETÍVEIS

**AUTOR: TIAGO GAZOLA**

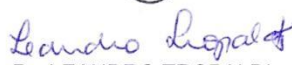
**ORIENTADOR: EDIVALDO DOMINGUES VELINI**

**COORIENTADOR: CAIO ANTONIO CARBONARI**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. EDIVALDO DOMINGUES VELINI  
Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal / FCA / UNESP de Botucatu/SP

  
PESQUISADOR CIENTÍFICO AILDSON PEREIRA DUARTE  
Centro de Grãos e Fibras / INSTITUTO AGRONÔMICO

  
Dr. LEANDRO TROPALDI  
Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia / FCA - Unesp Botucatu

Botucatu, 25 de julho de 2017.



*A Deus, Jesus Cristo e Nossa Senhora Aparecida.*

*Aos meus amados pais, Sérgio e Rosa.*

*A minha irmã Tamires.*

*A minha namorada Veridiana.*

*Dedico*





## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, Jesus Cristo e Nossa Senhora Aparecida por me guiarem e me iluminarem.

Aos meus pais, irmã e namorada pelo apoio total, essenciais nesta conquista.

Ao Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini, pela orientação, ensinamentos e dedicação, fundamentais para execução dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Caio Antônio Carbonari, pela coorientação, disponibilidade e auxílio na realização dos trabalhos.

Ao Pesquisador Dr. Aildson Pereira Duarte, pela ajuda e ensinamentos que, de alguma forma, contribuíram na realização destes estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Proteção de Plantas) da Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu-Unesp, pela oportunidade e formação.

A todos os amigos do Nupam, em especial ao Leandro Bianchi, Vitor Muller Anunciato, Márcio Furriela Dias e Edicarlos Batista de Castro, que contribuíram diretamente na execução dos trabalhos.

Aos amigos do Laboratório Nupam, José Guilherme Cordeiro, José Roberto Marques da Silva e Luiz Marcelo Siono pela amizade, aprendizado e colaborações nas atividades realizadas.

**Muito Obrigado !**



“E mesmo que meus passos sejam falsos, mesmo que meus caminhos sejam errados, mesmo que meu jeito de levar a vida incomode, eu sei quem sou, e sei pelo que devo lutar. Se você acha que meu orgulho é grande, é porque nunca viu o tamanho da minha fé!”.

José Dias Nunes (Tião Carreiro)



## RESUMO

As infestações com *Digitaria insularis* em áreas de culturas anuais e os casos de resistência ao herbicida glyphosate aumentaram nos últimos anos, e estes fatos contribuíram para tornar a espécie uma das mais importantes plantas daninhas do Brasil. Diante disso, foram desenvolvidos experimentos que tiveram como objetivo confirmar a resistência de biótipos de *D. insularis* perenizados e propagados vegetativamente resistentes ao glyphosate, bem como, compreender o perfil metabólico do herbicida nestas plantas, verificar se existe alteração no controle relativo em função dos métodos de propagação empregados e determinar o fator de resistência nas progênies obtidas por sementes autofecundadas. Foram realizados três experimentos em casa de vegetação no delineamento inteiramente casualizado, sendo os dois primeiros com oito biótipos de capim-amargoso considerados como suscetíveis e três com suspeita de resistência ao herbicida glyphosate. No primeiro experimento foi avaliado o controle das plantas aos 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação (DAA) do glyphosate. No segundo experimento, avaliou-se o controle nas mesmas épocas do primeiro e 72 horas após a aplicação do herbicida foi quantificado o acúmulo de ácido chiquímico e ácido quínico, deposição, absorção e translocação de glyphosate, concentração de AMPA, dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) e ácido salicílico. No terceiro experimento foram conduzidas curvas de dose-resposta com glyphosate nas doses de 0; 90; 180; 360; 720; 1440; 2880 e 5760 g e.a. ha<sup>-1</sup>, na progênie de quatro biótipos, e foram avaliados o controle e a massa seca aos 21 DAA para obtenção do fator de resistência. O método de propagação vegetativa se mostrou consistente e não alterou a resposta dos biótipos nos testes de fitointoxicação por glyphosate. Confirmou-se a resistência dos três biótipos pelo controle visual e acúmulo de ácido chiquímico e quínico. A metabolização em AMPA não é considerada mecanismo de resistência da espécie ao glyphosate. Os biótipos resistentes apresentaram maior concentração de ácido salicílico. As progênies obtidas por autofecundação apresentaram fator de resistência para EC<sub>50</sub> de 14,37 e 7,04 e para GR<sub>50</sub> 12,79 e 3,77.

**Palavras-chave:** ácido chiquímico, ácido aminometilfosfônico, capim-amargoso, resistência a herbicidas.

## ABSTRACT

*Digitaria insularis* occurrence infestations in annual crop and cases of glyphosate herbicide resistance have increased in recent years, and the facts contributed to make the species one of the most important weeds in Brazil. Therefore, experiments were carried out to confirm the resistance of perennial and vegetatively propagated *D. insularis* biotypes resistant to glyphosate, as well as to understand the metabolic profile of the herbicide in these plants, to verify if there is alteration in the relative control according to the methods and determine the resistance factor in the progenies obtained by self-fertilized seeds. Three experiments were carried out under greenhouse conditions in a completely randomized design, the first two with eight sourgrass biotypes considered as susceptible and three with suspected resistance to glyphosate herbicide. In the first experiment, the control of the plants at 7, 14, 21 and 28 days after glyphosate application (DAA) was evaluated. In the second experiment, the control was evaluated in the same periods of the first and 72 hours after the application of the herbicide was quantified the accumulation of shiquimic acid and quinic acid, deposition, absorption and translocation of glyphosate, concentration of AMPA, aromatic amino acids (phenylalanine, tyrosine and tryptophan) and salicylic acid. In the third experiment, dose-response curves were conducted with glyphosate at doses of 0; 90; 180; 360; 720; 1440; 2880 and 5760 g e.a. ha<sup>-1</sup>, in the progeny of four biotypes, and control and dry mass were evaluated at 21 DAA to obtain the resistance factor. The vegetative propagation method was consistent and did not alter the response of the biotypes in the glyphosate control tests. The resistance of the three biotypes was confirmed by the visual control and accumulation of shikimic and quinic acid. Metabolization in AMPA is not considered a resistance mechanism of the species to glyphosate. Resistant biotypes showed higher concentration of salicylic acid. The progenies obtained by self-fertilization presented a resistance factor for EC<sub>50</sub> of 14,37 and 7,04 and for GR<sub>50</sub> 12,79 and 3,77.

**Keywords:** Shiquimic acid, aminomethylphosphonic acid, sourgrass, resistance to herbicides.





## SUMÁRIO

	<b>Páginas</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b> 17
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b> 19
2.1	Capim-amargoso: Distribuição, morfologia e biologia..... 19
2.2	Glyphosate: Modo de ação..... 21
2.3	Plantas daninhas resistentes a herbicidas..... 25
2.3.1	Capim-amargoso: resistência ao glyphosate..... 32
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b> 34
3.1	Teste 1: Fitointoxicação por glyphosate em biótipos de capim- amargoso propagados vegetativamente..... 34
3.2	Teste 2: Fitointoxicação por glyphosate em biótipos de capim- amargoso propagados vegetativamente e ação do herbicida nas plantas..... 36
3.3	Curvas de dose-reposta em biótipos de capim- amargoso..... 42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b> 45
4.1	Testes de fitointoxicação por glyphosate em biótipos de capim- amargoso propagados vegetativamente e ação do herbicida nas plantas..... 45
4.2	Curvas de dose-reposta em biótipos de capim- amargoso..... 65
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b> 71
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b> 72



## 1 INTRODUÇÃO

Plantas daninhas são todas aquelas plantas que ocorrem onde não são desejadas (BLATCHLEY, 1912). Ainda, uma planta pode ser considerada daninha quando prejudica a atividade humana (SILVA e SILVA, 2007). Conforme a agricultura se desenvolvia, o homem passava a criar condições ideais de crescimento e desenvolvimento às culturas implantadas, por consequência, o preparo de solo empregado controlava as plantas daninhas ali presentes (CARVALHO, 2013). Porém, com o passar dos anos, algumas destas plantas sobreviviam e se multiplicavam pela disseminação de propágulos, e foi a partir daí que o ser humano passou a entender o conceito de planta daninha.

A resistência destas plantas a herbicidas surgiu após a adoção destes produtos como principal ferramenta de controle que passou a selecionar rapidamente estas plantas. A partir daí surge o conceito de resistência, que é definida pela Sociedade Americana de Ciência das Plantas Daninhas, como a habilidade hereditária de uma planta sobreviver e se reproduzir, após a exposição a uma dose de herbicida normalmente letal para o biótipo selvagem da espécie (HEAP, 2016).

Dentre os herbicidas registrados e utilizados no Brasil, o principal é o glyphosate, ele atua inibindo a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS) e bloqueia a rota do ácido chiquímico, responsável pela produção dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, que, além de serem utilizados na produção de proteínas nas plantas, atuam como precursores de um grande número de metabólitos secundários como pigmentos, flavonóides, auxinas, fitoalexinas, lignina e taninos (VELINI et al., 2009). Para este herbicida existem relatos de 37 casos de plantas daninhas resistentes em todo o mundo, e no Brasil, são 8 casos registrados (HEAP, 2017). Dentre estas plantas, está o capim-amargoso (*Digitaria insularis* (L.) Mez ex Ekman), que além de ser resistente a este herbicida, também apresenta algumas populações resistentes à fenoxaprop-P-ethyl, e haloxyfop-P-methyl (HEAP, 2017).

O capim-amargoso atualmente é considerado uma das principais plantas daninhas do país. Dentre os motivos estão a sua alta capacidade competitiva com a cultura da soja, que pode reduzir a produtividade da cultura em torno de 44% (GAZZIERO et al., 2012) e a distribuição da espécie, que atualmente, está dispersa em praticamente todas as regiões produtoras do país (LOPEZ-OVEJERO et al.

2017). Além disso, os resultados de pesquisa obtidos para compreender os mecanismos de resistência da espécie ao herbicida glyphosate ainda são controversos. Alguns destes mecanismos propostos são a absorção e translocação reduzidas, rápida metabolização deste herbicida e alterações de aminoácidos na sequência enzimática da enzima alvo (CARVALHO et al. 2012).

Faltam também informações com capim-amargoso perenizado, que é uma situação muito comum na agricultura, pois os resultados encontrados para os mecanismos de resistência e dinâmica do glyphosate para a espécie contemplam plantas jovens obtidas através de sementes. Diante destes fatos, tornou-se necessário o desenvolvimento desta pesquisa, que teve como objetivo confirmar a resistência de biótipos de *D. insularis* perenizados e propagados vegetativamente resistentes ao glyphosate, bem como, compreender o perfil metabólico do herbicida nestas plantas, verificar se existe alteração no controle relativo em função dos métodos de propagação empregados e determinar o fator de resistência nas progênes obtidas por sementes autofecundadas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Capim-amargoso: Distribuição, morfologia e biologia

O Brasil é o país que tem a maior diversificação de plantas do gênero *Digitaria* spp. com a constatação de 26 espécies nativas e 12 exóticas (DE MARIA et al., 2006). Dentre elas, destaca-se o capim-amargoso (*Digitaria insularis* (L.) Mez ex Ekman), uma gramínea da família Poaceae, ordem Poales, classe Monocotiledone, perene e que realiza fotossíntese pelo ciclo C4 (KISSMANN; GROTH, 1997).

*D. insularis* é nativa das Américas, onde é facilmente encontrada em áreas de pastagens, cafezais, pomares, rodovias, cidades e em áreas com cultivos anuais (MACHADO et al., 2008). Atualmente, essa espécie se tornou uma das principais plantas daninhas do Brasil e está amplamente disseminada (BRANDÃO et al., 1995; CARVALHO; PITELLI, 1992; BRIGHENTI et al., 2003; PEREIRA; VELINI, 2003; OLIVEIRA; FREITAS, 2008; KUVA et al., 2008). É uma planta agressiva, sua matocompetição pode interferir fortemente na produção de espécies de interesse econômico, como é o caso da soja, onde infestações com 4 a 8 plantas m<sup>2</sup> reduzem a produtividade da cultura em torno 44% (GAZZIERO et al., 2012).

Trata-se de uma planta com porte herbáceo e ereto, mede entre 0,5 e 1,50 m de altura e se reproduz tanto por sementes quanto por rizomas, a partir dos quais, formam densas touceiras (LORENZI, 2000). Os colmos são cilíndricos e canaliculados, apresentam entrenós longos pouco ou nada ramificados com até 1 cm de espessura na base (KISSMANN; GROTH, 1997).

O sistema radicular desta planta é fasciculado, apresenta curtos rizomas ramificados, fibrosos e com presença de amido (MACHADO et al., 2008).

A lâmina foliar é lanceolada, ligeiramente áspera, anfiestomática, com até 40 centímetros de comprimento por 1 cm de largura, apresenta esparsos pêlos e margens finamente serrilhadas (MACHADO et al., 2008). Ainda para os autores, o capim-amargoso proveniente de rizomas, em comparação aos oriundos de sementes, apresenta folhas com maior índice estomático e lâmina foliar mais espessa em ambas as faces da epiderme. A maior espessura deste tecido é característica de plantas adaptadas a condições de sombreamento (CASTRO et al., 1987; TAIZ; ZEIGER, 2004). Por este motivo, espera-se que o capim-amargoso perenizado seja mais tolerante a supressão de luz realizada pela cultura.

A inflorescência é do tipo panícula ramificada, terminal e em formato de espiga, possui até 30 cm de comprimento, é alocada sobre longas hastes e cada panícula é constituída de 20 a 50 espigas (KISSMANN; GROTH, 1997; MOREIRA; BRAGANÇA, 2010). As espigas possuem coloração branco-prateada, e são constituídas por numerosas espiguetas pareadas e rodeada por pêlos sedosos, o que facilita a sua distinção de outras espécies (KISSMANN; GROTH, 1997; MOREIRA; BRAGANÇA, 2010).

As sementes são do tipo cariopse e recobertas por inúmeros pêlos dos quais facilitam sua disseminação à grandes distâncias, principalmente pelo vento, e, ainda, possuem alto percentual germinativo (KISSMANN; GROTH, 1997). Em uma mesma touceira ocorrem vários fluxos de florescimento, sendo que, cada fluxo pode produzir, em média, entre 6,5 a 50 mil sementes por planta (FRAGA et al., 2016).

Quanto à germinação do capim-amargoso, por suas sementes serem muito pequenas, sua emergência depende da profundidade em que está no solo, da umidade, luz e da temperatura (PYON et al., 1977; GOMES; CHRISTOFFOLETI, 2008). De acordo com Pyon et al. (1977), a uma profundidade de até 3 cm no solo tem-se em torno de 80% de germinação, e quando estão dispostas a 4 cm é reduzida para 10%. Já para Reinert (2013), que estudou a viabilidade de sementes desta espécie, verificou que elas só se tornam inviáveis quando estão dispostas a pelo menos 5 cm de profundidade no solo por mais de 180 dias.

A luz e a temperatura também são fatores importantes a serem considerados, no entanto, existem algumas divergências nos resultados encontrados. Quando a temperatura é constante, entre 20 a 30° C, a germinação depende da presença de luz, e quando alternadas, entre 15 e 35° C, independem da luz e apresentam índices germinativos próximos de 90% após 10 dias (MONDO et al., 2010). Além disso, de acordo com Pyon (1975), quando estas sementes são expostas a luz, por um período de 8 a 12 horas, germinam mais rapidamente com índices próximos a 70% em 5 dias. Já para Mayer e Poljakoff Mayber (1989); Vázquez-Yanes e Orozco-Segovia (1993), independente dos biótipos serem suscetíveis ou resistentes ao glyphosate, a luz não influencia na germinação de *D. insularis*, e que a temperatura ótima está entre 25 e 30° C. Entretanto, recentemente, Mendonça et al. (2014) verificaram que as sementes do capim-amargoso dependem da luz para germinarem, sendo a temperatura de 35° C combinado com a luz a condição mais favorável, e que 45° C neste período é letal.

A quantidade de cobertura vegetal presente no solo também exerce influência na emergência do capim-amargoso. Segundo Reinert (2013), ao estudar os aspectos da biologia desta espécie, verificou maior índice de emergência nos locais onde não havia cobertura de palha, e, nos locais com cobertura a partir de 4 t ha<sup>-1</sup>, a emergência foi afetada independente dos materiais serem suscetíveis ou resistentes ao herbicida glyphosate.

Quanto ao crescimento da espécie, também não existe um consenso entre os pesquisadores sobre os resultados experimentais relatados, isso evidencia a influência que a temperatura e o fotoperíodo exercem sobre a biologia desta planta. Em geral, o capim-amargoso possui crescimento inicial lento, em média dos 35 a 45 dias após sua emergência (DAE), principalmente em locais sombreados ou que estejam com temperaturas mais baixas, permitindo que a espécie seja suprimida pelo desenvolvimento mais rápido de outras espécies daninhas ou até mesmo da cultura instalada (MACHADO et al., 2006). De acordo com os autores, a partir dos 35 à 45 DAE, a planta forma rizomas, densas touceiras e tem crescimento intenso até os 105 dias, à partir daí o crescimento é reduzido em função da senescência.

Quando o capim-amargoso germina na primavera, com fotoperíodo crescente, floresce com 80 a 100 DAE e apresenta maior acúmulo de matéria seca (CARVALHO; NICOLAI, 2016). Quando germina no final do verão, em condição de fotoperíodo decrescente, floresce entre 63 e 70 DAE e apresentam menor acúmulo de massa seca (MACHADO et al., 2006). No entanto, a espécie floresce o ano todo e de modo mais intenso no início da primavera.

## **2.2 Glyphosate: Modo de ação**

O glyphosate (N-Fosfometil-glicina) é um herbicida que possui ação em pós-emergência, pertence ao grupo químico das glicinas substituídas, apresenta amplo espectro de controle e ação sistêmica (GALI, 2009), sendo translocado preferencialmente via floema com posterior acúmulo nos tecidos meristemáticos e órgãos subterrâneos (MONQUERO et al., 2004). Não apresenta ação residual no solo, sendo rapidamente adsorvido nos colóides e degradado por microorganismos, principalmente a AMPA (ácido aminometilfosfônico) e CO<sub>2</sub> (GIMSING et al., 2004). É o único herbicida que bloqueia a EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase),

e isso compromete uma série de processos fundamentais para as plantas crescerem e se desenvolverem (VELINI et al., 2009).

Quando o glyphosate é aplicado em plantas sensíveis a ele, os danos geralmente se desenvolvem de forma lenta e a morte acontece após vários dias e até mesmo semanas. A estabilidade *in vivo* do glyphosate nas plantas é muito importante na contribuição de seus efeitos fitotóxicos irreversíveis (VELINI et al., 2009). Os sintomas mais comuns que se observa após a pulverização em plantas suscetíveis são a paralisação do crescimento, murchamento, regiões meristemáticas e folhas novas amareladas, folhas avermelhadas, encarquilhamento, branqueamento e posteriormente necrose e morte da planta.

O glyphosate é um herbicida pós-emergente que, quando aplicado, é lentamente absorvido pela cutícula das folhas devido a sua alta solubilidade (log de  $k_{ow}$  aproxima-se a - 4), isso exige um período de aproximadamente 6 horas sem chuva, dependendo da formulação utilizada, para correta absorção e controle satisfatório das plantas suscetíveis (KRUSE et al., 2000). A diferença de concentração do produto aplicado, entre o local que ele foi depositado na planta e o que foi encontrado em seu interior, pode influenciar sua taxa de absorção. É por este motivo que a elevação da concentração de glyphosate na superfície da folha aumenta a sua absorção (BUHLER; BURNSIDE, 1983; LIU et al., 1996; FRANZ et al., 1997). Segundo estes autores, este é o motivo do glyphosate, quando aplicado com baixo volume de calda, ter sua eficácia aumentada.

A principal dificuldade para a absorção pelas folhas é o aparecimento de tecido suberificado nas regiões velhas e a deposição de cutina, que forma a cutícula das folhas, responsáveis por impedir a livre movimentação de gases e soluções (RODRIGUES, 2009). Segundo Chachalis et al. (2001), diferenças na hidrofobicidade da cutícula pode refletir na absorção do glyphosate, sendo que, quando a cutícula possui maior grau hidrofóbico a eficiência do glyphosate é reduzida.

Quanto a movimentação na planta sabe-se que para um herbicida ser translocado até a enzima alvo é necessário que o mesmo seja absorvido pela membrana plasmática, ou seja, o glyphosate precisa entrar no simplasto. A penetração de glyphosate nas células é mediada por proteínas transportadoras de fosfato, que são encontradas na membrana plasmática (MERVOSH; BALKE, 1991). O fato de o glyphosate ter seu transporte facilitado por proteínas é muito importante,



pois, a expressão do gene associado a síntese desta proteína pode alterar a eficácia com que este herbicida é absorvido e transportado nas plantas (VELINI et al., 2009). Plantas ou genótipos com maior expressão do gene associado a essa proteína, provavelmente, terão uma maior absorção e translocação do glyphosate tornando-as mais suscetíveis (VELINI et al., 2009).

A translocação do glyphosate ocorre preferencialmente via floema, no entanto, também pode ocorrer movimento apoplástico em menor intensidade, além disso, este composto aparentemente tem dificuldade de penetrar no floema, contudo, uma vez ali localizado é altamente móvel (GOUGLER; GEIGER, 1984; FRANZ et al., 1997). Várias teorias podem explicar esta dificuldade de penetração do glyphosate no floema, tais como: a inibição da fixação de CO<sub>2</sub>, a interrupção da síntese de amido, a limitação do uso de amido armazenado, danos à integridade dos elementos crivados e limitação do fluxo de importação e descarregamento de sacarose (GEIGER; BESTMAN, 1990).

O transporte deste herbicida no floema percorre pelo mesmo caminho dos açúcares que são produzidos na fotossíntese, ou seja, movem-se das folhas em direção aos frutos e/ou sistema radicular (RODRIGUES, 2009). De posse destas informações, é possível afirmar que a translocação do glyphosate nas plantas sofre influência da quantidade de açúcar que é transportada para cada uma de suas partes durante o seu ciclo de vida (MONQUERO et al., 2004). Portanto, a translocação de glyphosate é facilitada por condições que favoreçam a fotossíntese da planta (DELLA-CIOPPA et al., 1986).

O sítio de ação deste herbicida é a enzima 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase (EPSPs E.C. 2.5.1.19) presente na rota da síntese de fenilalanina, tirosina e triptofano (KRUSE et al., 2000). Ela é codificada no núcleo das células, atua nos cloroplastos e a biossíntese destes aminoácidos ocorre primariamente nos plastídeos (VAUGHN; DUKE, 1991; READE; COBB, 2002). Quando a EPSPS é inibida, a entrada de carbono na rota do ácido chiquímico é influenciada pelo aumento da atividade de 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHPS), uma enzima responsável por catalisar a transformação de eritrose-4-fosfato junto com fosfoenolpiruvato e formar corismato, que por sua vez, é precursor dos aminoácidos aromáticos (DEVINE et al., 1993). A atividade da DAHPS é aumentada devido as concentrações reduzidas de arogenato (composto que inibe a alteração da DAHP e que está localizado depois da EPSP na rota), provocando

níveis elevados de ácido chiquímico, pois a rota é interrompida quando a EPSPS é inibida (VELINI et al. 2009).

A quantidade de ácido chiquímico que se acumula, devido a desregulação da rota, provoca uma forte drenagem de carbono no ciclo de Calvin por conta do desvio de eritrose-4-fosfato que seria utilizado para regenerar a ribulose bifosfato (GEIGER et al., 1986; GEIGER et al., 1987; SERVIATES et al., 1987; SHIEH et al., 1991). Esse é um importante efeito da inibição causada pelo glyphosate, que reduz drasticamente a produção fotossintética. O acúmulo de ácido chiquímico também bloqueia a síntese dos aminoácidos aromáticos (VIDAL, 1997). Além disso, a rota do ácido chiquímico é responsável por formar os compostos secundários, que representam até cerca de 35% de toda biomassa de um vegetal (BOUDET et al., 1985).

Portanto, o acúmulo de ácido chiquímico desregula o metabolismo do carbono nas plantas levando a um aumento de sua concentração intracelular, isso reduz a atividade fotossintética e limita a translocação do herbicida. Além disso, impede a formação de corismato, precursor dos aminoácidos aromáticos, fundamentais para a continuidade da síntese proteica nas plantas, a partir dos quais, são produzidos vários metabólitos secundários como ácido indol acético (AIA), fenóis, flavonoides, fitoalexinas e lignina (COLE, 1985; LYDON; DUKE, 1988; HAHLBROCK; SCHEEL, 1989; WHETTEN; SEDEROFF, 1995; GRUYS; SIKORSKI, 1999).

O AIA é uma auxina responsável por promover o crescimento das plantas, ele deriva do aminoácido triptofano, e, portanto, sua biossíntese é inibida pela ação do glyphosate (YAMADA; CASTRO, 2007). Sua síntese também depende do indol-3-glicerol fosfato, que por sua vez, necessita do corismato para ser formado. Portanto, o glyphosate bloqueia totalmente a síntese de AIA (YAMADA; CASTRO, 2007).

Os ácidos fenólicos são compostos secundários sintetizados pelas plantas e que atuam na defesa contra insetos e patógenos (fitoalexinas), dão suporte mecânico (lignina/celulose), servem como atrativos para polinizadores (antocianinas), protegem os vegetais da radiação ultravioleta e ainda podem reduzir o desenvolvimento de plantas próximas (TAIZ; ZEIGER, 2004). Segundo estes autores, a rota do ácido chiquímico tem participação na biossíntese da maioria dos fenóis vegetais. O'Brien e Prendeville (1979), ao medirem o teor de eletrólitos lixiviados, observaram que a concentração de  $10^{-1}$  mM de glyphosate promoveu aumento da permeabilidade da membrana celular de *Lemna minor* entre 12 e 24

horas, e com  $10^{-2}$  mM entre 48 e 96 horas. De acordo com Duke et al. (2006), subdoses de glyphosate aumenta a suscetibilidade de soja a doenças como *Phytophthora megasperma* e *Pseudomonas syringae*, e *Colletotrichum lindemuthianum* e *Pythium* spp. em feijoeiro. Para estes autores, essa predisposição está relacionada a lignificação e a produção de fitoalexinas nas plantas, pois ambas passam pela rota do chiquimato.

### 2.3 Plantas daninhas resistentes a herbicidas

Existem várias definições de resistência, cada qual com a sua complementação, uma delas é descrita pela Sociedade Americana de Ciência das Plantas Daninhas como a capacidade que um biótipo tem de sobreviver e conseguir se reproduzir depois de ter sido exposto a uma dose de herbicida, que normalmente seria fatal para a sua espécie, característica esta que é hereditária (HEAP, 2016). O primeiro relato de resistência a herbicidas foi na década de 1950, nos Estados Unidos, com *Convolvulus arvensis*, uma planta de folha larga, trepadeira e perene, resistente ao herbicida 2,4-D (CHRISTOFFOLETI et al., 2016). Atualmente tem-se registro de 993 casos de plantas daninhas resistentes a herbicidas em 66 países (HEAP, 2017). No Brasil são 45 casos, o primeiro foi para *Bidens pilosa* em 1993 resistente a herbicidas inibidores da ALS, e o último relato para *Conyza sumatrensis* com resistência aos herbicidas inibidores da Protóx (HEAP, 2017).

Já a tolerância destas plantas a herbicidas é definida como a capacidade que uma espécie tem de sobreviver e conseguir se reproduzir, mesmo que sofra injúrias, depois de ter sido exposta a uma dose de herbicida, que normalmente seria fatal para outras espécies (CHRISTOFFOLETI et al., 2016). Em outras palavras é uma característica que já existe antes mesmo da planta receber aplicação do produto, como exemplo as espécies *Ipomoea* spp. e *Commelina* spp. que são tolerantes ao glyphosate e nunca foram bem controladas pelo herbicida.

A suscetibilidade pode ser definida como o grau de injúria ou morte da planta observados após a aplicação de um herbicida, sendo esta uma característica inerente de cada espécie, nesta situação, a planta morre por não suportar a ação do herbicida (CHRISTOFFOLETI et al., 1994).

A resistência de plantas daninhas a herbicidas pode ser classificada como simples, cruzada ou múltipla. Simples, quando biótipos de plantas daninhas são

resistentes a um único herbicida dentro de um mesmo mecanismo de ação. Para este caso tem-se como exemplo a planta daninha *Chloris elata* que apresenta resistência somente ao herbicida glyphosate (HEAP, 2017).

A resistência cruzada acontece quando as plantas daninhas são resistentes a dois ou mais herbicidas, de diferentes grupos químicos, porém que pertençam a um mesmo mecanismo de ação. Como exemplo de planta daninha, tem-se *Lolium multiflorum* que é resistente a herbicidas inibidores da ACCase (HEAP, 2017), neste caso, o azevém é resistente a dois grupos químicos deste mecanismo (ariloxifenoxipropionatos e ciclohexanodionas). Ainda, pode haver variações no nível de resistência dentro de um mesmo grupo químico (CHRISTOFFOLETI et al. 2016; AGOSTINETTO; VARGAS, 2009). Foram encontrados níveis de resistência cruzada em *Euphorbia heterophylla* aos herbicidas pertencentes ao grupo químico das imidazolinonas e sulfoniluréias, ambos inibidores da ALS (XAVIER, 2014).

Já a resistência múltipla é quando as plantas daninhas possuem resistência a mais de um herbicida que pertencem a diferentes mecanismos de ação. Um exemplo é o *Amaranthus palmeri*, no Brasil ele é resistente aos herbicidas inibidores da ALS e ao glyphosate (HEAP, 2017). Este tipo de resistência é mais problemático, pois a planta passa a ter diferentes mecanismos de resistência que irão conferir resistência a diferentes mecanismos de ação de herbicidas, e isso limita o número de ingredientes ativos eficazes para seu controle.

Biótipos resistentes sempre estão presentes na área, porém em uma baixa frequência (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2008). De acordo com estes autores, quando um herbicida é pulverizado, ele atua como agente de pressão de seleção, a planta daninha suscetível morre e a resistente sobrevive e se multiplica sem a presença da suscetível. Se uma planta resistente consegue completar seu ciclo, produzirá centenas ou milhares de sementes e, nas próximas safras, ocorrerá multiplicação destas plantas. Geralmente quando o problema é detectado, ele já é expressivo, pois só se percebe a resistência quando cerca de 30% das plantas apresentam esta característica (MAXWELL; MORTIMER, 1994).

A evolução da resistência é afetada por diversos fatores que são classificados como genéticos, bioecológicos ou agrônômicos, e são eles que determinarão o tempo necessário para os biótipos resistentes tornarem-se predominantes na área (MATIELLO et al., 1999; CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2008).

Biótipos adaptados a determinado ambiente normalmente competem mais com os demais e são capazes de aumentar sua população ao decorrer dos anos, e por consequência, eliminam os menos adaptados (SAARI et al., 1994). Para os autores, os indivíduos resistentes possivelmente apresentam menor adaptação ecológica nesses locais e mesmo assim podem se tornarem predominantes, caso as plantas suscetíveis sejam eliminadas.

A variabilidade genética entre plantas daninhas de mesma espécie permite que elas consigam evoluir e se adaptar a novos locais. O capim-amargoso é uma planta que apresenta alta variabilidade, Martins (2013) constatou em seu trabalho, com uso de primers aleatórios, que o DNA de plantas de capim-amargoso resistentes e suscetíveis ao glyphosate apresentaram variação de 56,6%. É provável que isso esteja relacionado com a sua taxa de fecundação cruzada, embora seja uma planta predominantemente autógama, ou seja, o seu genoma variado pode ser responsável pela rápida evolução da resistência.

A frequência inicial de um gene que promove a resistência é um fator muito importante que afeta a evolução da resistência (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2008). Quanto maior for esta frequência, menor é o período de tempo para que os indivíduos resistentes aumentem sua proporção com aplicações sucessivas de um mesmo herbicida (VIDAL; FLECK, 1997). Para alguns herbicidas essa frequência inicial é conhecida, por exemplo, para as triazinas essa frequência está entre  $10^{-10}$  e  $10^{-20}$  plantas (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2008). Já para os Inibidores da ACCase essa frequência inicial é mais alta,  $10^{-6}$  plantas (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2008). Quanto maior a frequência inicial, maior e mais rápida é a chance de que plantas resistentes aumentem na população com a aplicação sucessiva de um mesmo herbicida. Inibidores da ACCase por exemplo, demoram de 6 a 8 anos para selecionar populações resistentes, enquanto glyphosate em torno de 20 anos (PRESTON, 2003).

Outro fator muito importante é a dominância do gene que tem envolvimento com a resistência. Na maior parte dos mecanismos de ação essa característica é determinada por genes dominantes ou semi-dominantes que estão localizados no DNA nuclear de células (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2008). Segundo estes autores quando a herança é originada do núcleo das células, os genes que promovem a resistência possivelmente serão transmitidos através dos grãos de pólen para outra planta suscetível da mesma espécie e, através da recombinação

sexual, a progênie poderá ser resistente a determinado mecanismo de ação de herbicida. Já, se a herança da resistência for citoplasmática ou maternal, localizada em organelas como cloroplasto ou mitocôndria, a transmissão só ocorrerá naquela geração (MATIELLO et al., 1999).

O tipo de fecundação é outro fator que influencia na dispersão da resistência. Plantas resistentes e autógamas tem velocidade de dispersão reduzida, quando comparadas as de fecundação cruzada; o motivo é a dificuldade do fluxo gênico entre plantas vizinhas (VIDAL; FLECK, 1997). Nas plantas alógamas as chances de ocorrerem múltiplos mecanismos de resistência é muito maior devido a recombinação genética.

O Número de alelos envolvidos na resistência é outro fator que influencia na disseminação desta característica, quando depende de um único gene, a possibilidade de ocorrer é maior e de forma mais rápida do que se depender de vários genes, pois, para haver este tipo de resistência, é preciso que ocorram recombinações genéticas entre as plantas por várias gerações até que se obtenha o número correto de alelos que confirmam resistência ao indivíduo (VIDAL; FLECK, 1997). A resistência de origem poligênica é mais demorada, porém favorece a ocorrência de múltiplos mecanismos de resistência devido a recombinação de genes (VIDAL; FLECK, 1997). No Brasil, a resistência da espécie *Euphorbia heterophylla* aos herbicidas inibidores da ALS é codificada por um gene dominante de origem nuclear (VARGAS et al., 2001). Já para o capim-amargoso a herança genética ainda não é conhecida.

Dentre os fatores bioecológicos que aceleram a evolução da resistência estão: espécies com fenologia curta, grande produção e dispersão de sementes com dormência reduzida, muitos ciclos reprodutivos em um mesmo ano e alta variabilidade nos genes (CHRISTOFFOLETI et al., 1994; VARGAS, 2003). Quanto mais alongado o período de dormência, mais tempo necessitará para eliminar o banco de sementes no solo dos indivíduos suscetíveis (CHRISTOFFOLETI et al., 1994). A quantidade destas plantas é muito importante, pois, indivíduos resistentes sempre estarão presentes, e quanto mais, maiores são as chances de que plantas resistentes estejam presentes (KISSMANN, 2003).

O capim-amargoso, por exemplo, teve seu primeiro foco de resistência ao herbicida glyphosate detectado em 2005 no Paraguay e no Brasil em 2008 (Heap, 2017). Em 2015 já é possível encontrar *D. insularis* resistente ao glyphosate em

praticamente todas as regiões produtoras de grãos do País (LOPEZ-OVEJERO et al. 2017). Essa grande dispersão se deve, principalmente, as características da planta como sementes altamente viáveis, leves e pilosas. Além disso, muitos produtores da região sul do país possuem propriedades agrícolas no cerrado brasileiro e o trânsito de implementos para estas regiões também facilitaram a dispersão da espécie.

Quanto aos fatores agrônômicos estão as características dos herbicidas e as práticas adotadas no manejo. Fazer uso de herbicidas residuais, utilizar um mesmo princípio ativo repetitivamente, adotar herbicidas altamente eficientes no controle dos biótipos suscetíveis e aplicações em doses elevadas, são medidas que proporcionam um aumento muito grande na pressão de seleção e favorecem o desenvolvimento da resistência (CHRISTOFFOLETI et al., 1994; VIDAL; FLECK, 1997; VARGAS, 2003).

Ao fazer uso de um herbicida com residual prolongado, a germinação dos biótipos suscetíveis será controlada pelo produto aumentando a pressão de seleção de biótipos resistentes, pois as sucessivas germinações de várias gerações das plantas poderão ficar expostas ao produto aplicado, aumentando a proporção de plantas resistentes. O caso se agrava se ocorrerem vários fluxos de germinação no mesmo ano, como é o caso do capim-amargoso. Além disso, o ideal seria que o efeito residual do herbicida utilizado permanecesse atuante apenas durante o período crítico de competição entre a cultura e as espécies daninhas, para que os próximos fluxos fossem controlados somente com o sombreamento promovido pela cultura (CHRISTOFFOLETI et al., 1994).

Utilizar herbicidas pós-emergentes, que não apresentem ação residual, também favorece o aumento da pressão de seleção caso as aplicações sejam realizadas repetidamente sempre que notada a presença das plantas daninhas (CHRISTOFFOLETI et al., 1994). Utilizar sempre um mesmo herbicida no manejo de uma espécie por vários anos agrícolas seguidos favorece a seleção de biótipos resistentes. Ao alternar o mecanismo de ação, o biótipo resistente ao herbicida utilizado anteriormente é eliminado, quebrando seu ciclo.

Se o herbicida é altamente eficiente e controla 100% das plantas suscetíveis, por exemplo, também favorece a pressão de seleção. Ao controlar todas as plantas suscetíveis, só sobram as resistentes para produzirem sementes, desta forma o banco de sementes dos biótipos suscetíveis tende a diminuir e a dos resistentes aumentar (CHRISTOFFOLETI et al. 1994).

Doses acima da recomenda podem aumentar a velocidade de eliminação dos biótipos suscetíveis, favorecendo o processo de seleção de biótipos resistentes (CHRISTOFFOLETI et al. 1994).

O plantio direto e cultivo mínimo também podem favorecer o aparecimento de algumas plantas daninhas. O desenvolvimento destas plantas pode ser facilitado devido a presença de sementes produzidas juntamente com a cultura anterior, e que ficaram preservadas na superfície do solo (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2008), favorecendo o desenvolvimento de plantas resistentes, pois a quantidade de sementes presentes no banco do solo, que seria utilizada para germinação e emergência destas plantas é menor (MADSEN; JENSEN, 1998). Além disso, a maior emergência de plantas daninhas implica no uso de maiores quantidades de herbicidas. Já no sistema de plantio convencional a quantidade de herbicidas utilizados é menor, devido ao revolvimento do solo e ao controle mecânico promovido pelos implementos utilizados, que, conseqüentemente, diminuem a pressão de seleção (BOERBOOM, 1999).

Quanto ao surgimento de plantas daninhas resistentes, pode-se dizer que os motivos são os diferentes mecanismos que conferem essa característica as plantas e uma delas está relacionado a alteração no local de ação do herbicida (POWLES; PRESTON, 2006). Esse tipo de resistência pode ocorrer devido a substituições de aminoácido/s na enzima alvo, impedindo que o herbicida se acople adequadamente ao local de ação (POWLES; YU, 2010). O primeiro caso relatado para esse tipo de mecanismo foi em biótipos de *Eleusine indica*, na Malásia, devido à substituição do aminoácido prolina por uma serina na Pro-106 (Pro-106-Ser) (LEE; NGIM, 2000). Estas substituições na Pro-106 conferem um nível pequeno de resistência ao glyphosate por se tratar de uma região conservada da enzima, ou seja, de difícil alteração (POWLES; YU, 2010). Já substituições na Gly-96 ou Thr-97 conferem alto nível de resistência (ESCHENBURG et al., 2002; FUNKE et al., 2009).

A resistência pode também estar relacionada com a super expressão enzimática (POWLES e YU, 2010), este tipo promove alta resistência ao herbicida glyphosate e foi constatado em plantas de *Amaranthus palmeri* (GAINES et al., 2010). Neste caso há um aumento no número de cópias da enzima EPSPS, conseqüentemente, as plantas que apresentam esse mecanismo conseguem sobreviver a ação do herbicida. Ainda, Gaines et al. (2012) demonstraram que pode haver hibridação interespecífica entre espécies do gênero *Amaranthus* spp. Este é um ponto muito



importante no que diz respeito ao manejo destas plantas daninhas, haja vista que, o gene responsável pela resistência pode ser transmitido para outras espécies do gênero *Amaranthus* spp., restringindo as opções de controle.

A absorção reduzida de herbicidas também pode ter relação com a resistência de plantas daninhas, nestes casos, menor quantidade do herbicida penetra na planta e, conseqüentemente, menos produto atingirá a enzima alvo. Biótipos de azevém resistentes apresentam redução na penetração da folha após aplicação do glyphosate em torno de 39% quando comparados aos suscetíveis (MICHITTE et al., 2007). Para esta mesma espécie, Nandula et al. (2008) evidenciaram diferença de até 43% na redução da penetração de glyphosate pelos biótipos resistentes.

A translocação reduzida de herbicida em determinadas plantas também é considerado como um mecanismo de resistência, o resultado final é o mesmo da absorção limitada, ou seja, reduz a quantidade do produto que chega a enzima alvo, permitindo que a planta sobreviva a aplicação do herbicida. Este mecanismo de resistência tem sido confirmado em várias espécies de *Lolium*, *Conyza* e *Sorghum halepense* (WAKELIN; LORRAINE COLWILL; PRESTON, 2004; POWLES; PRESTON, 2006; YU et al., 2009; SHANER, 2009; GE et al., 2011; BOSTAMAM et al., 2012; VILA-AIUB et al., 2013; ADU-YEBOAH et al., 2014; CARDINALI et al., 2015). Experimentos com uso de ressonância nuclear magnética para constatar a presença de glyphosate, em células *in vivo* e compartimentos celulares, identificaram que essa dificuldade na translocação está relacionado ao sequestro do glyphosate e posterior acúmulo em tecidos inativos como o vacúolo (GE et al., 2013). Neste mesmo experimento foi verificado acúmulo de 10 vezes mais glyphosate nos vacúolos de biótipos resistentes de *Conyza canadensis* em relação ao suscetível.

Outro tipo de mecanismo de resistência é a diferença que as plantas daninhas resistentes possuem para metabolizar os herbicidas. No solo e nas plantas, o ácido aminometilfosfônico (AMPA) é o principal composto gerado pela metabolização do glyphosate (REDDY et al., 2004). Para algumas espécies tolerantes ao glyphosate, como *Agropyron repens* e *Equisetum arvense*, por exemplo, este metabólito pode ser detectado (COUPLAND, 1985; DYER, 1994). Na planta a metabolização do glyphosate em AMPA pode ocorrer pela enzima GOX (glyphosate oxiredutase) onde o produto da reação pode ser tóxico para aquelas que possuem EPSPs insensível a este herbicida (NANDULA et al., 2007). Quando a planta resistente apresenta este

mecanismo de ação, o glyphosate passa a ser metabolizado pela planta a compostos não tóxicos e, conseqüentemente, esta planta sobrevive.

### **2.3.1 Capim-amargoso: resistência ao glyphosate**

O primeiro caso mundial de resistência do capim-amargoso ao glyphosate foi comprovado em 2005 no Paraguai em lavouras de milho, soja e algodão (HEAP, 2017). Em 2008 foi relatado o primeiro caso no Brasil, no Paraná em lavouras de Milho e Soja (HEAP, 2017). Mais recentemente, em 2016, relatou-se resistência da espécie a alguns herbicidas inibidores da ACCase (fenoxaprop e haloxyfop) no estado do Mato Grosso em lavouras de soja (HEAP, 2017).

A alta variabilidade genética das plantas daninhas pode ser responsável pelas diferenças comportamentais entre populações da mesma espécie aos mais diversos ambientes. Esta é uma importante característica, pois expressa a capacidade de resposta que a planta tem frente a seleção natural e as pressões que são exercidas pelas técnicas adotadas no manejo (LI et al., 2007). Apesar de ser uma planta autógama, o capim-amargoso resistente e suscetível ao herbicida glyphosate apresentam diferenças em seu DNA em torno de 56,6%, caracterizando alta variação na sequência enzimática desta espécie (MARTINS, 2013), que pode ser explicada pelo fato do capim-amargoso apresentar também uma taxa de fecundação cruzada (FRAGA et al., 2016). Essa variabilidade genética pode implicar em diferenças morfológicas, fisiológicas e genéticas, podendo alterar significativamente sua capacidade de resistir a ação dos herbicidas. De acordo com Christoffoleti; López-Ovejero (2008), uma população em que os seres presentes tenham variação genética para resposta a uma determinada medida de controle, com o tempo, terão alteração nos indivíduos presentes nela e isso é uma forma de sobreviverem ao controle empregado, e por conseqüência, a sensibilidade destas plantas a esta medida adotada será diminuída.

A transmissão de genes que conferem resistência, a um determinado herbicida, de populações resistentes para suscetíveis é dada pela chegada das sementes na área e também através da dispersão de pólen, neste caso, se houver polinização cruzada entre a(s) espécie(s) envolvida(s) (MELO, 2015). Portanto, plantas daninhas que possuem polinização cruzada terão maior dispersão da resistência na população devido a maior recombinação genética (JASIENIUK et al., 1996). A

herança da resistência de *D. insularis* ao herbicida glyphosate ainda é desconhecida, mas a hipótese de Melo (2015) ao estudar a herança genética da resistência de *D. insularis*, é que a resistência a este herbicida pode ser poligênica pois não houve alteração na resposta ao glyphosate após o cruzamento dos biótipos suscetível e resistente na progênie F1.

Quanto aos mecanismos que conferem resistência do capim-amargoso ao glyphosate, até o momento, provavelmente devido a sua alta taxa de polimorfismo, não há um consenso da comunidade científica. Carvalho et al. (2012), observaram que o biótipo suscetível absorveu cerca de 12% a mais de <sup>14</sup>C-glyphosate que o biótipo resistente as 48 horas após a aplicação. Ainda segundo estes autores, com 96 horas após a aplicação em biótipo resistente, 70% do glyphosate ficou retido na folha tratada e 17,78% foi translocado até as raízes, já para o suscetível 42,94% ficou retido na folha e 32,23% translocou para as raízes. Melo (2015) obteve valores semelhantes na absorção e translocação e concluiu em seus estudos que estes não são mecanismos de resistência.

Outro mecanismo de resistência proposto são alterações na sequência enzimática da EPSPs em biótipos resistentes. Galeano et al. (2016), encontraram alterações de aminoácidos nas posições 15 e 143 da EPSPs, com substituições dos aminoácidos prolina por treonina e tirosina por cisteína, respectivamente. Já Carvalho et al. (2012) encontraram alterações dos mesmos aminoácidos nas posições 182 e 310 do códon. No entanto, Galeano et al. (2016) sugeriram que uma das alterações encontradas são facultativas, e portanto, podem ou não estar presente em biótipos de capim-amargoso resistente, porém o aminoácido cisteína parece ser fundamental para a resistência da espécie ao glyphosate.

O metabolismo de glyphosate por plantas de capim-amargoso em AMPA, glioxilato e sarcosina também são propostos como mecanismos de resistência a este herbicida. Segundo Carvalho et al. (2012), o biótipo resistente metaboliza rapidamente o herbicida nestes compostos, sendo uma importante característica de resistência. No entanto, Galeano et al. (2016) mencionam que é mais provável que a resistência esteja relacionada a níveis aumentados da enzima EPSPs nas plantas resistentes.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos três experimentos em casa de vegetação no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM), pertencente ao Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Campus de Botucatu, SP. Para os experimentos foram coletados, entre janeiro e fevereiro de 2016, 11 biótipos de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) em áreas rurais (Tabela 1).

**Tabela 1** — Localidade da coleta dos biótipos de *Digitaria insularis* utilizadas nos experimentos, Botucatu – SP, 2017

<b>Biótipos</b>	<b>Latitude</b>	<b>Longitude</b>	<b>Altitude</b>	<b>Município</b>
S1	22° 49' 50"	48° 25' 34"	781	Botucatu, SP
R1	22° 48' 27"	48° 25' 46"	733	Botucatu, SP
S2	22° 51' 5"	48° 25' 29"	766	Botucatu, SP
S3	22° 59' 38"	49° 38' 6"	479	Ipaussu, SP
S4	22° 59' 42"	49° 38' 9"	487	Ipaussu, SP
S5	22° 55' 12"	49° 19' 21"	599	Óleo, SP
S6	22° 55' 14"	49° 19' 23"	600	Óleo, SP
S7	22° 55' 19"	49° 19' 26"	597	Óleo, SP
R2	22° 50' 33"	48° 25' 29"	813	Botucatu, SP
R3	22° 50' 27"	48° 25' 26"	869	Botucatu, SP
S8	22° 59' 46"	49° 38' 12"	491	Sta Cruz do Rio Pardo, SP

#### 3.1 Teste 1: Fitointoxicação por glyphosate em biótipos de capim-amargoso propagados vegetativamente

Após a coleta das touceiras, as mesmas foram lavadas em água corrente para remoção de impurezas, desfragmentadas manualmente e seus propágulos transplantados em dois tipos de vasos. No primeiro tipo, os vasos apresentavam

capacidade para 25L e foram utilizados para preservação das matrizes, sendo preenchidos com solo de textura argilosa, devidamente adubados e corrigidos, com as seguintes características físico/químicas: 552, 199 e 245 g dm<sup>-3</sup> de argila, silte e areia, respectivamente; pH (CaCl<sub>2</sub>) = 4,9; Matéria orgânica = 22,5 g dm<sup>-3</sup>; P (resina) = 15,5 mg dm<sup>-3</sup>; Al<sup>3+</sup> = 1,8 mmolc dm<sup>-3</sup>; H+Al = 47,5 mmolc dm<sup>-3</sup>; K<sup>+</sup> = 1,4 mmolc dm<sup>-3</sup>; Ca<sup>2+</sup> = 22,5 mmolc dm<sup>-3</sup>; Mg<sup>2+</sup> = 10,5 mmolc dm<sup>-3</sup>; SB = 35 mmolc d<sup>-3</sup>; CTC (T) = 82,5 mmolc dm<sup>-3</sup>; S = 55 mg dm<sup>-3</sup> e V% = 40,5.

O segundo tipo de vaso, com capacidade para 2 L, utilizado para composição das parcelas do experimento, foram preenchidos com substrato Carolina II com as seguintes características físico/químicas: turfa de sphagnum, vermiculita expandida, casca de arroz torrefado, calcário dolomítico, gesso agrícola e traços de NPK; condutividade elétrica (CE) = 0,7 mS cm<sup>-1</sup> ± 0,3; pH 5,5; densidade 155 kg m<sup>-3</sup>; capacidade de retenção de água 55%. O transplantio foi realizado no dia 11 de fevereiro de 2016 com 1 propágulo por vaso (1 rizoma desfragmentado + sistema radicular + perfilhos podados acima do primeiro internódio). Aos 30 dias após o transplantio foi realizada uma poda de nivelamento, e, quando as plantas apresentavam entre 40 e 60 cm de altura foi realizada a aplicação de glyphosate.

Para a aplicação foi utilizado um pulverizador estacionário (Figura 1), instalado no NUPAM. Ele possui estrutura em metal para suporte da barra de pulverização de 2 metros de comprimento. A barra percorre por 6 metros com auxílio de um motor elétrico e possui um modulador de frequência que controla a velocidade de trabalho. Foram utilizadas na barra quatro pontas XR 11002 VS, com espaçamento de 0,5 metros e altura de 0,5 metros em relação às plantas. A pressão de trabalho adotada foi de 196,13 kPa e velocidade de 3,6 km h<sup>-1</sup>, que gerou um consumo de calda de 200 L ha<sup>-1</sup>. O produto comercial utilizado foi o Roundup Original® da fabricante Monsanto, na formulação de sal de isopropilamina com concentração de 360 g e.a. L<sup>-1</sup>, na dosagem de 1.440 g e.a. ha<sup>-1</sup>. No momento da aplicação a temperatura e umidade relativa média estavam em 32°C e 51%, respectivamente.



**Figura 1** — Pulverizador estacionário com as unidades experimentais no momento da aplicação. Botucatu – SP, 2017

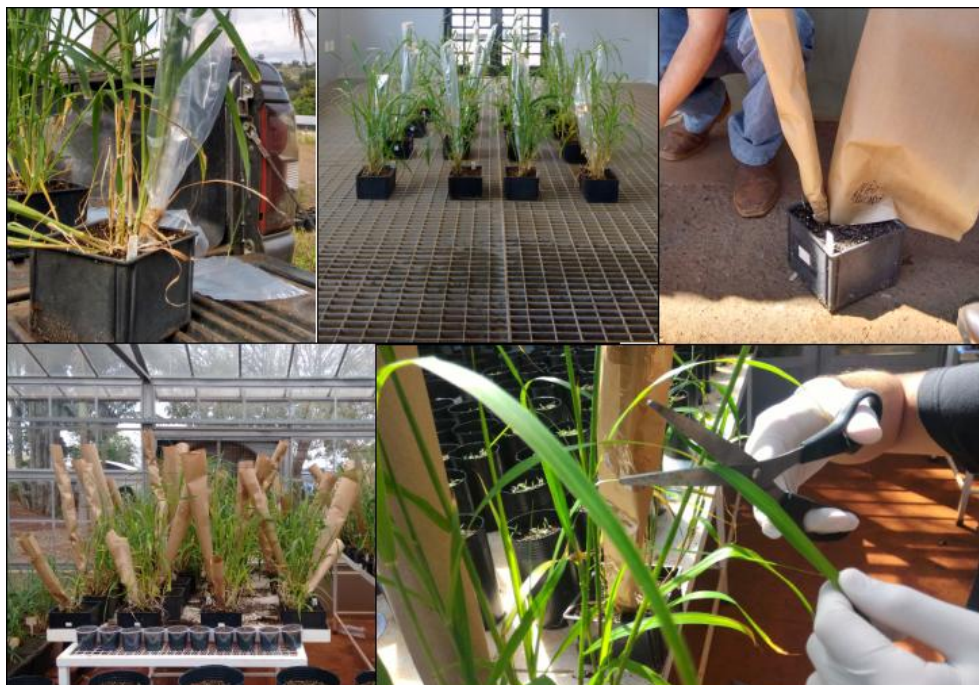
O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, composto de 11 tratamentos (biótipos) e quatro repetições. Realizaram-se avaliações visuais de controle das plantas aos 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação (DAA), segundo escala percentual de controle, em que “0” corresponde a nenhum controle e “100” significa a morte das plantas, conforme Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (1995).

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste de F, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **3.2 Teste 2: Fitointoxicação por glyphosate em biótipos de capim-amargoso propagados vegetativamente e ação do herbicida nas plantas**

Os biótipos utilizados foram os mesmos do experimento anterior, sendo seus propágulos obtidos através das matrizes preservadas. O transplântio deste estudo ocorreu no dia 05 de outubro de 2016 e a aplicação no dia 05 de novembro do mesmo ano, sendo que o transplântio ocorreu da mesma forma descrita no primeiro experimento. No entanto, para a aplicação não foi realizada poda de nivelamento de modo que não houvesse interferência na absorção do herbicida devido ao dano mecânico que seria provocado. As plantas apresentavam os mesmos tamanhos (entre 40 e 60 cm de altura) e foram divididas em duas seções, sendo: três perfilhos

protegidos e demais não protegidos (Figura 2). No momento da aplicação a temperatura e umidade relativa média estavam em 31°C e 62%, respectivamente.



**Figura 2** — Procedimentos para proteção dos perfilhos de *Digitaria insularis* no momento da aplicação de glyphosate e coleta das amostras utilizadas na quantificação dos compostos. Botucatu – SP, 2017

Após a aplicação, as plantas permaneceram em ambiente aberto com a proteção plástica até secagem das gotas pulverizadas. Em seguida, essa proteção foi substituída por folhas de papel 80 g m<sup>-2</sup>, de modo que os perfilhos que foram protegidos no momento da aplicação não murchassem e não tivessem contato físico com o restante dos perfilhos, nas plantas que receberam a aplicação de glyphosate, onde permaneceram assim por 72 horas em casa de vegetação. Foi fixado este período para quantificação dos compostos para garantir que a quantidade de glyphosate absorvida fosse suficiente, pois, de acordo com Carvalho et al. (2012), a absorção de glyphosate em capim-amargoso é mais intensa à partir das 72 horas após a aplicação e se estabiliza neste período.

Após este período, em todas as plantas foram utilizados sacos de papel devidamente identificados, para coleta de todas as folhas: em três perfilhos ao acaso e que receberam herbicida na aplicação, nos três perfilhos protegidos no momento da aplicação, e, por fim, em três perfilhos ao acaso em cada biótipo que não recebeu a aplicação do herbicida (testemunhas). Com a parte aérea restante nas plantas

vivas, foram realizadas avaliações visuais de controle aos 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação (DAA), segundo escala a percentual de controle, em que “0” corresponde a nenhum controle e “100” significa a morte das plantas, conforme Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (1995).

As folhas provenientes dos perfilhos aplicados foram acondicionadas em sacos plásticos e lavadas por três vezes com 100 mL de água destilada, para total remoção dos resíduos que permaneceram sobre a cutícula das folhas do capim-amargoso. O saco plástico foi agitado por um período de 30 segundos e a água proveniente da triplice lavagem foi misturada e acondicionada em tubos “falcon” de 50 mL, filtrado em filtro Millex HV (Millipore) 0,45 µm com membrana durapore 13 mm, e acondicionados em vial âmbar 9 mm (Flow Supply) com 2 mL de capacidade, para posterior quantificação do glyphosate que permaneceu depositado nas folhas, por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas (LC-MS/MS).

Para quantificação da absorção de glyphosate e extração dos compostos ácido chiquímico, ácido quínico, ácido aminometilfosfônico (AMPA), ácido salicílico e os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano nas folhas dos perfilhos aplicados, seguiu-se a metodologia proposta por Gomes (2011). Para isso, as folhas após serem lavadas foram colocadas em sacos de papel para secagem em estufa de circulação forçada de ar a 40°C durante 5 dias até o material vegetal estar totalmente seco. Em seguida, as amostras foram maceradas em almofariz contendo nitrogênio líquido, pesados 0,1 g do material e acondicionados em tubos falcon com capacidade para 15 mL. Após isso, foi adicionado no tubo 10 mL de água acidificada a pH 2,5 com uma pipeta automática (Gilson). Os tubos foram levemente agitados e então submetidos a banho de ultra-som (Elma – Elmasonic P 180 H) à 37 KHz durante 30 minutos, a uma temperatura de 55°C.

Após a realização da extração, todas as amostras foram submetidas à centrifugação a 2755 g, durante 10 minutos a 20°C (Rotina 38R). O sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro Millex HV (Millipore) 0,45 µm, com membrana durapore 13 mm, e acondicionados em vial âmbar 9 mm (Flow Supply), com 2 mL de capacidade, para posterior quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas (LC-MS/MS) (Figura 3).



Nas folhas provenientes dos perfilhos protegidos e nas testemunhas, não foi realizada a tríplice lavagem das folhas e procedeu-se a mesma metodologia descrita anteriormente.



**Figura 3** — Procedimentos para extração dos compostos a partir de amostras secas e maceradas. Botucatu – SP, 2017

A quantificação foi realizada por LC-MS/MS (Figura 4), que consiste em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) da marca Shimadzu, modelo Proeminence UFLC. Ele possui duas bombas LC-20AD, auto injetor SIL-20AC, degazeificador DGU-20A5, sistema controlador CBM-20A (torna a operação automatizada) e forno CTO-20AC (controla a temperatura da coluna). Fica acoplado ao HPLC um espectrômetro de massas TRIPLE QUAD 4500 (AB SCIEX), híbrido triplo quadrupolo, onde: Q1 e Q3 são usados como filtros de massa e Q2 é uma célula de colisão em que as moléculas intactas e fragmentos de Q1 são quebrados em fragmentos de massas de menor tamanho.



**Figura 4** — Cromatógrafo Líquido (Proeminence UFLC) acoplado ao espectrômetro de massas TRIPLE QUAD 4500 (AB SCIEX). Botucatu - SP, 2017

O modo utilizado para as análises foi o proposto por Araújo (2008), que consiste no triplo quadrupolo, onde Q3 é usado para detectar apenas a massa de um fragmento conhecido (filho) da molécula intacta (pai) que tem massa conhecida e foi filtrada por Q1. Segundo o autor, este modo quantitativo é o padrão que se utiliza para metabólitos alvo, e tem como vantagens a alta sensibilidade e reprodutibilidade, bem como, ruído de baixo nível, e ainda, consegue medir simultaneamente até 100 compostos.

De acordo com Gomes et al. (2015), para otimizar as condições do espectrômetro de massas foram realizadas injeções diretas com solução analítica padrão de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de cada composto individualmente. A partir das infusões, foi escolhido o modo de ionização da fonte (IES – Ionização por eletrospray), que produz íons do analito na fase líquida antes de entrarem no espectrômetro de massas. O modo de ionização negativo foi utilizado para os seguintes compostos: glyphosate, AMPA, ácido chiquímico, ácido quínico e ácido salicílico. Para fenilalanina, tirosina e triptofano utilizou-se o modo de ionização positivo.

As condições cromatográficas utilizadas para quantificar os compostos no modo de ionização positivo e negativo foram: Coluna analítica Gemini  $5 \mu \text{ C18 110 \AA}$  (150 mm x 4,6 mm), com duas fase móvel sendo elas a Fase A (FA) = 5 mM acetato de amônio em água e a Fase B (FB) = 5 mM acetato de amônio em metanol. O gradiente utilizado foi 0 – 1 minuto = 10% FB e 90% FA; 1 – 4 minutos = 95% FB e

5% FA; 4 – 8 minutos = 95% FB e 5% FA; 8 – 10 minutos = 10% FB e 90% FA; 10 – 12 minutos = 10 FB e 90%. O fluxo foi 0,600 ml min<sup>-1</sup>.

A detecção e separação dos compostos foram realizadas em corrida, com a ionização dos compostos em modo positivo e negativo com tempo total de 12 minutos simultaneamente. Cada composto possui um tempo de retenção na coluna cromatográfica, sendo eles: glyphosate (2,89 minutos); AMPA (2,89 minutos); ácido chiquímico (2,95 minutos); ácido quínico (3,25 minutos); ácido salicílico (5,33 minutos); fenilalanina (5,98 minutos); tirosina (4,71 minutos); e triptofano (6,17 minutos). O íon utilizado para quantificação dos compostos foi sempre o primeiro fragmento gerado a partir de cada molécula, os dados se encontram na Tabela 2.

**Tabela 2** – Massa molecular dos compostos e fragmentos gerados por HPLC MS/MS. Botucatu – SP, 2017

Composto	Massa molecular	Fragmentos
Glyphosate	169,08	163,1 – 150,0 – 78,9
AMPA	111,04	62,9 – 78,9 – 89,8
Ácido chiquímico	174,15	93,0 – 111,0 – 73,0
Ácido quínico	192,17	84,9 – 93,9 – 59,1
Ácido salicílico	136,97	93,0 – 91,5 – 64,9
Fenilalanina	165,19	120,1 – 103,1 – 77,1
Tirosina	181,19	91,1 – 136,1 – 123,1
Triptofano	204,23	188,2 – 146,1 – 118,1

Já as curvas analíticas para os compostos foram construídas em faixas de concentração como descreve a Tabela 3.

**Tabela 3** – Curvas analíticas dos compostos gerados por HPLC MS/MS. Botucatu – SP, 2017

Composto	Equação da reta	r <sup>2</sup>	Intervalo linear
Glyphosate	y= 2,79e+003x + 1,6e+004	0,9931	2,34 – 600
AMPA	y= 295x + 367	0,9966	2,34 – 600
Ácido chiquímico	y= 226x + 1,15e+004	0,9907	18,93 – 4800
Ácido quínico	y= 477x + 1,04e+005	0,9917	75,00 – 4800
Ácido salicílico	y= 7,26e+004x + 1,1e+005	0,9933	0,58 – 150
Fenilalanina	y= 2,82e+004x + 2,7e+005	0,9931	2,34 – 600
Tirosina	y= 1,27e+004x + 1,28e+004	0,9962	2,34 – 600
Triptofano	y= 3,45e+004x + 6,19e+004	0,9957	2,34 – 300

Para determinação da absorção de glyphosate, realizou-se a soma da concentração total do herbicida encontrada internamente em todas as folhas dos perfilhos que receberam a aplicação e em todas as folhas nos perfilhos protegidos no momento da aplicação. Na determinação da concentração dos demais compostos analisados adotou-se o mesmo procedimento. A quantidade de glyphosate que translocou nas plantas, foi determinada utilizando somente a concentração do herbicida encontrada internamente nas folhas provenientes dos perfilhos protegidos no momento da aplicação.

Os resultados da análise visual de sintomas e as concentrações dos compostos avaliados ( $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca - MS) foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A correlação entre o acúmulo de ácido chiquímico, ácido quínico e a porcentagem de controle obtida aos 28 DAA também foram submetidas ao teste de F, sendo significativo, procedeu-se a análise de regressão utilizando o modelo de Gompertz com o software estatístico Origin 8. Em que:

$$y = a * \exp^{-\exp(-k x - xc)}$$

a = amplitude da curva; xc = centro da curva; k = 1 constante; y = porcentagem de controle; x = concentração de ácido chiquímico ou ácido quínico

### 3.3 Curvas de dose-reposta em biótipos de capim-amargoso

Na condução deste experimento, foram selecionados quatro biótipos de capim-amargoso oriundos das matrizes preservadas em casa de vegetação, sendo dois resistentes (R2 e R3) e dois suscetíveis (S2 e S3) para autofecundação e produção de sementes. Para isso, quando as plantas se encontravam em fase de pré-florescimento (antes da emissão das panículas), os perfilhos foram protegidos com sacos de papel de modo que impedisse a troca de material genético entre as plantas vizinhas, e, posteriormente, as sementes foram coletadas.

A semeadura ocorreu no dia 05 de janeiro de 2017 em vasos com capacidade para 350 ml, devidamente preenchidos com substrato comercial Carolina II, a

aproximadamente 1 cm de profundidade. Após a emergência, procedeu-se o desbaste mantendo apenas quatro plantas por unidade experimental.

A aplicação dos tratamentos ocorreu no dia 06 de fevereiro de 2017 quando as plantas apresentavam entre 40 e 60 cm de altura com 4 a 6 perfilhos (Figura 5). Foi utilizado o mesmo pulverizador já descrito para os experimentos anteriores (Figura 1). O produto comercial utilizado foi o Roundup Original® da fabricante Monsanto, na formulação de sal de isopropilamina e concentração de 360 g e.a. L<sup>-1</sup>, nas dosagens de 0; 90; 180; 360; 720; 1440; 2880 e 5760 g e.a. ha<sup>-1</sup>. No momento da aplicação a umidade relativa média e a temperatura estavam em aproximadamente 27°C e 70%, respectivamente.



**Figura 5** — Estádio de desenvolvimento dos biótipos de *Digitaria insularis* no momento da aplicação do herbicida. Botucatu - SP, 2017

O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado, composto por oito tratamentos (doses) e quatro repetições para cada biótipo utilizado. As plantas foram submetidas a avaliações visuais de controle das plantas aos 21 dias após a aplicação (DAA), segundo escala percentual, em que “0” corresponde a nenhum controle e “100” significa a morte das plantas, conforme Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (1995). Também aos 21 DAA foi avaliada a massa seca, para isso a parte aérea foi cortada e seca em estufa de circulação forçada de ar a uma temperatura de 60°C por 72 horas até que a massa mantivesse constante, posteriormente, procedeu-se a pesagem em balança de precisão 0,0001 g.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste de F, sendo significativo, construíram-se as curvas de dose-resposta. Para isso os dados foram

ajustados ao modelo de regressão não-linear log-logístico proposto por Seefeldt et al. (1995):

$$y = a + \frac{b}{1 + \frac{x}{c} d}$$

em que:  $y$  = percentual de controle ou massa seca;  $x$  = dose do herbicida;  $a$  = limite inferior da curva;  $b$  = diferença entre o ponto máximo e mínimo da curva;  $c$  = dose que proporciona 50% de resposta da variável e  $d$  = declividade da curva.

Os valores da dose que controla 50% da população ( $EC_{50}$ ) ou que promovem redução de 50% na massa seca ( $GR_{50}$ ) foram utilizados para obter o fator de resistência ( $FR = R/S$ ), que expressa o número de vezes em que a dose necessária para  $C_{50}$  ou  $GR_{50}$  da população resistente é superior a dose para  $EC_{50}$  ou  $GR_{50}$  da população suscetível (HALL et al., 1998). A resistência é confirmada quando  $FR > 1,0$  (SAARI et al., 1994).

As doses do herbicida utilizado para alcançar os níveis  $EC_{50}$  e  $GR_{50}$  nos biótipos resistentes e suscetíveis de *D. insularis* foram calculadas com auxílio do software estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Testes de fitointoxicação por glyphosate em biótipos de capim-amargoso propagados vegetativamente e ação do herbicida nas plantas

Como os biótipos em estudo foram multiplicados por propagação vegetativa, ou seja, se encontravam em estágio perenizado, houve a necessidade da realização de dois testes para melhor compreensão do comportamento das plantas após a aplicação do glyphosate ao longo do tempo. A cada multiplicação é possível ocorrer pequenas variações no tamanho das plantas devido ao método empregado, e isso pode refletir em diferenças na deposição do herbicida e, posteriormente, apresentar diferenças nos resultados de controle obtidos. Além disso, o método de propagação empregado impede o aumento no número de repetições em cada biótipo devido a própria limitação física da planta. Ainda, foi necessário estender as avaliações de controle até os 28 dias após a aplicação (DAA), de modo que fosse possível observar possíveis rebrotas na parte aérea das plantas em estudo. No entanto, essa rebrota não foi observada nos biótipos avaliados em ambos os testes realizados.

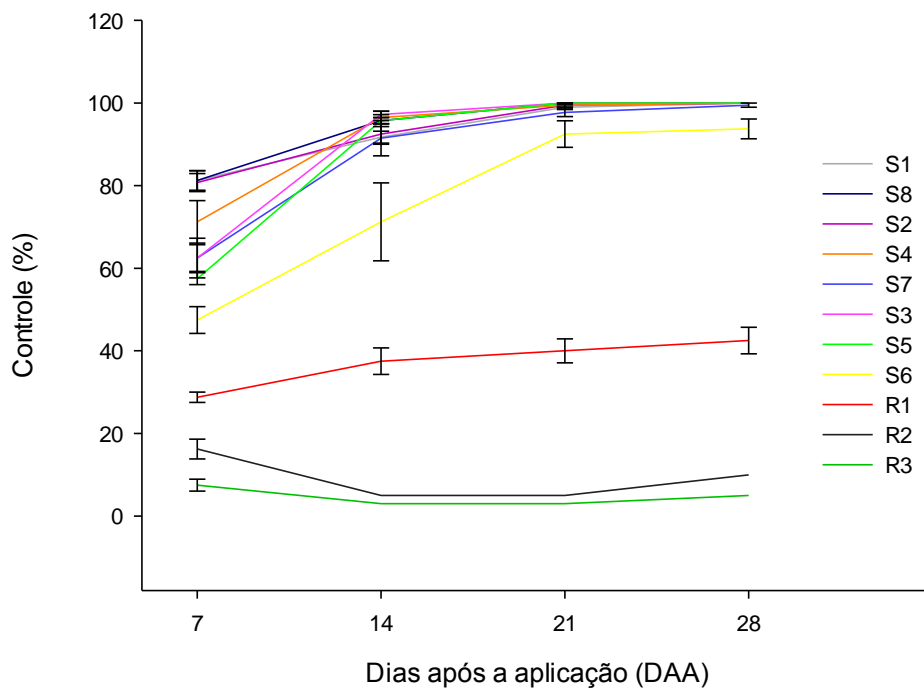
Na Tabela 4 encontra-se a análise de variância para os testes de fitointoxicação por herbicida glyphosate realizado nos biótipos estudados.

**Tabela 4** — Resumo da análise de variância para os testes de fitointoxicação de *Digitaria insularis* aos 7, 14, 21 e 28 DAA de glyphosate. Botucatu – SP, 2017

ANOVA	7 DAA	14 DAA	21 DAA	28 DAA
	Teste 1			
F	77,72**	117,10**	840,37**	994,46**
CV (%)	10,99	9,77	3,60	3,15
DMS	14,57	16,87	6,68	5,96
ER	2,98	3,45	1,36	1,22
Teste 2				
F	19,12**	395,94**	161,15**	66,34**
CV (%)	11,26	4,83	6,39	8,90
DMS	21,28	8,63	12,43	17,81
ER	4,35	1,76	2,54	3,64

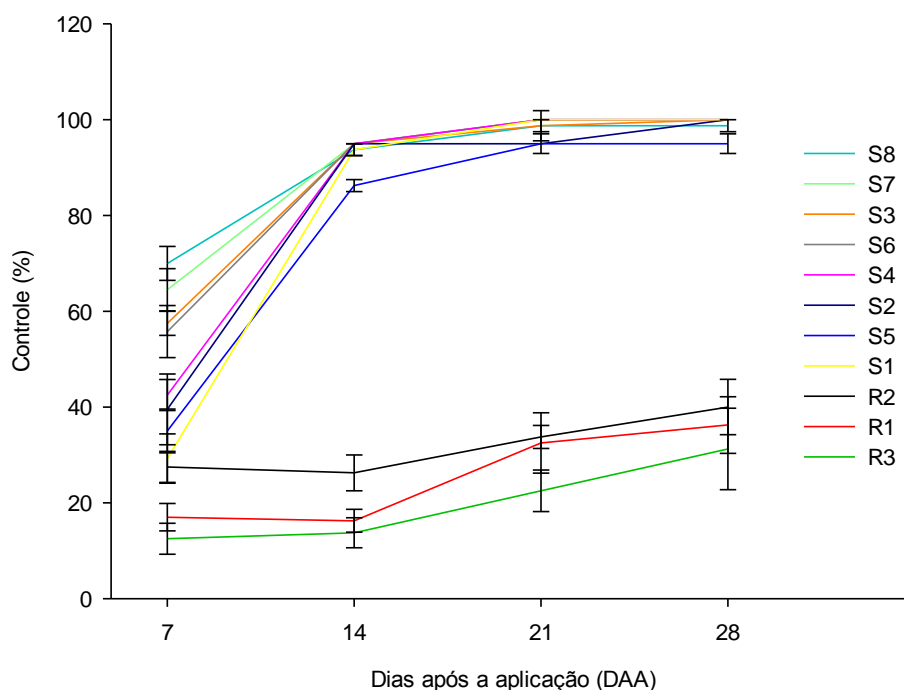
DAA – Dias após a aplicação. \*\*Significativo a 1% de probabilidade. DMS – Diferença mínima significativa. ER - erro padrão. CV – Coeficiente de variação.

Aos 7 DAA foi possível observar que os biótipos R1, R2 e R3 apresentaram controle inferior aos demais em ambos os testes executados (Figuras 6 e 7). No primeiro teste aos 14 DAA o biótipo possivelmente resistente R1 apresentou controle intermediário pouco acima de 30%, enquanto R2 e R3 não ultrapassaram 5% (Figura 6). Já o biótipo suscetível S6 já apresentava uma taxa de controle efetiva e a partir dos 21 DAA o controle ultrapassou os 90% (Figura 6). No segundo teste de fitointoxicação, aos 14 e 21 DAA o biótipo R1 atingiu índices inferiores que ficaram entre 18 e 30% de controle, R2 entre 25 e 35% e R3 obteve entre 15 e 20% de controle (Figura 7). Enquanto que no mesmo período, os suscetíveis S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 E S8 apresentaram controle acima de 80% (Figura 7).



**Figura 6** — Fitointoxicação por glyphosate no teste 1 em onze biótipos de *Digitaria insularis* propagados vegetativamente aos 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação (DAA). As barras de erros correspondem a média do erro padrão (n=4). Botucatu – SP, 2017





**Figura 7** — Fitointoxicação por glyphosate no teste 2 em onze biótipos de *Digitaria insularis* propagados vegetativamente aos 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação (DAA). As barras de erros correspondem a média do erro padrão (n=4). Botucatu – SP, 2017

O controle inferior a 80% ao final dos dois testes para os biótipos R1, R2 e R3 já era um indicativo de que estas plantas seriam resistentes ao herbicida glyphosate, pois segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, um herbicida precisa apresentar eficácia acima de 80% em sua dose de registro para que seja recomendado para o controle de determinada espécie (FAO, 2006). Além disso, os ensaios foram conduzidos em ambiente controlado e, portanto, a dose aplicada tende a ser mais eficaz nas plantas daninhas em comparação a uma aplicação em condições de campo. Isso ocorre devido a muitas variáveis que podem estar envolvidas tais como, clima, práticas de manejo, estresses e condição do equipamento pulverizador.

Todavia, para a confirmação da resistência destes biótipos ao glyphosate, no segundo teste de fitointoxicação foram quantificados os níveis de ácido chiquímico e quínico 72 horas após a aplicação do herbicida (HAA) em todas as plantas avaliadas. Os resultados da análise de variância para o acúmulo de ácido chiquímico e quínico estão descritos na Tabela 5.

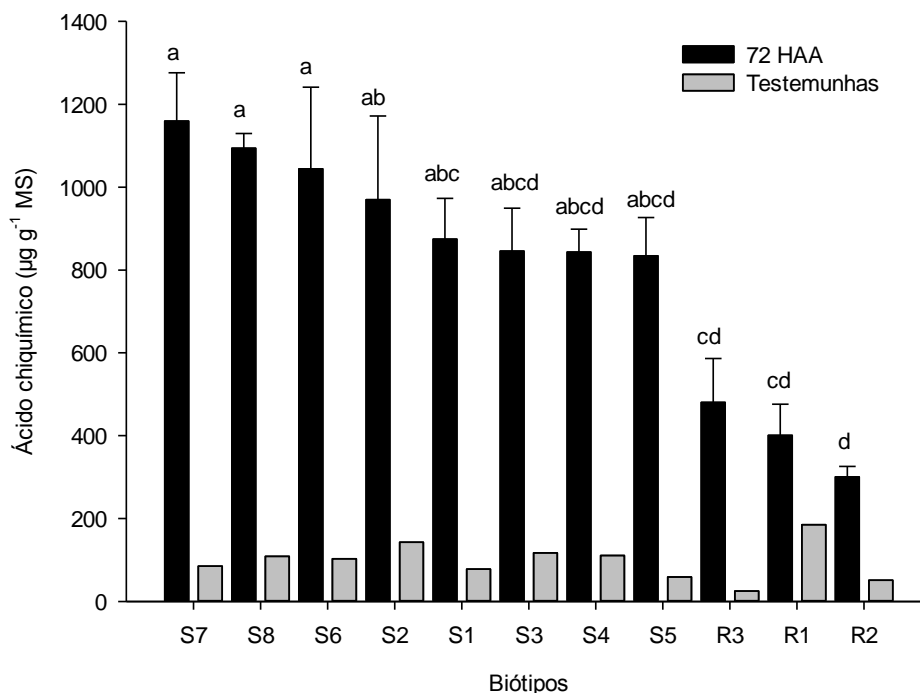
**Tabela 5** — Resumo da análise de variância para o acúmulo de ácido chiquímico e quínico 72 horas após a aplicação de glyphosate em biótipos de *Digitaria insularis*. Botucatu – SP, 2017

ANOVA	Ácido chiquímico	Ácido quínico
F	6,31**	5,02**
CV(%)	28,44	20,49
DMS	558,56	971,96
ER	114,39	199,05

\*\*Significativo a 1% de probabilidade. DMS – Diferença mínima significativa. ER - erro padrão. CV – Coeficiente de variação.

A Figura 8 mostra claramente a diferença na concentração do ácido chiquímico 72 HAA nos biótipos avaliados. Observa-se que as testemunhas apresentaram níveis reduzidos do composto em relação as plantas que receberam a aplicação, principalmente nos biótipos S7, S8, S6, S2, S1, S3, S4 e S5, considerados suscetíveis, com valores aproximados entre 850 à 1150  $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca as 72 HAA. Já os biótipos R3, R1 e R2, que apresentaram taxas de controle inferiores a 40%, apresentaram menor concentração de ácido chiquímico, com valores entre 300 e 480  $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca as 72 HAA (Figura 8), caracterizando estas plantas como menos sensíveis ao herbicida glyphosate.

O glyphosate atua inibindo a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS) que catalisa a condensação do ácido chiquímico e do fosfato piruvato, essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas (ZABLOTOWICZ; REDDY, 2004). Ao aplicar este herbicida em uma planta suscetível, ocorre um acúmulo de chiquimato devido a desregulação de sua rota, sendo um indicativo de que a EPSPS está sendo inibida (POWLES; PRESTON, 2006). Já quando se realiza a aplicação de glyphosate em uma planta resistente, a não total inibição da EPSPS impede o acúmulo de ácido chiquímico, e conseqüentemente, permite a sobrevivência da planta.



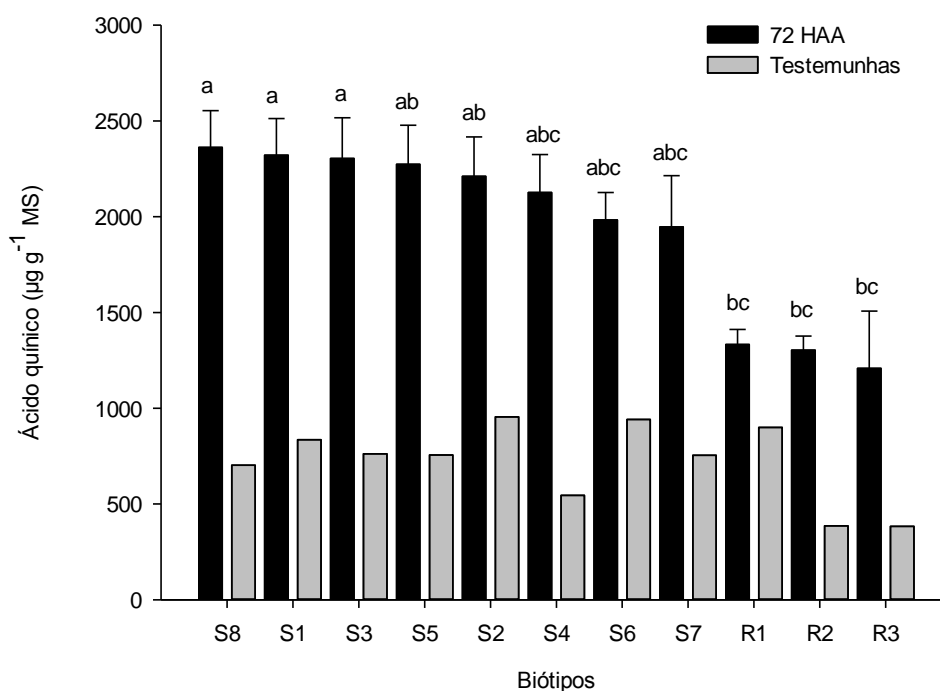
**Figura 8** — Acúmulo de ácido chiquímico em biótipos de *Digitaria insularis* 72 horas após a aplicação de glyphosate (HAA) e nas testemunhas não tratadas. As barras de erros correspondem a média do erro padrão (n=4) e letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Botucatu – SP, 2017

Esses resultados no acúmulo de ácido chiquímico podem, portanto, inferir que o composto pode ser utilizado como marcador de plantas resistentes, assim como já descreveram Haring et al. (1998); Singh e Shaner (1998); Feng et al. (2004); Maria et al. (2006); Buehring et al. (2007); Nandula et al. (2007); Petersen et al. (2007); Reddy et al. (2004); Matallo et al. (2009); Gonzalez-Torralva et al. (2010); Reddy et al. (2010); Orcaray et al. (2010); Carvalho et al. (2012).

Já para ácido quínico, também analisado 72 HAA, nota-se que o composto apresentou maior acúmulo em comparação ao ácido chiquímico, sendo que, após a exposição ao herbicida, nos biótipos resistentes o acúmulo de ácido quínico variou entre 1.200 e 1.300  $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca e nos suscetíveis a concentração ficou entre 1.900 e 2.400  $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca (Figura 9).

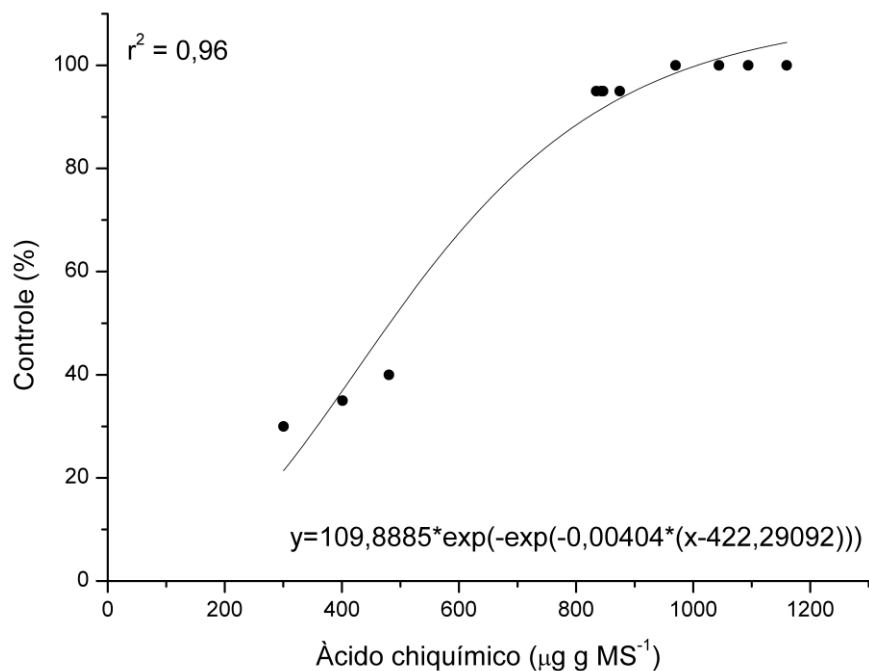
O ácido quínico está presente nas células das plantas e possui estrutura bem parecida com a do ácido chiquímico, sendo precursor dos hidroxibenzoicos, como protocatecuico e gálico (ORCARAY et al., 2010 e 2012), e que pode ser sintetizada na planta de duas formas: a partir do 3-desidroquinato (DHQ), catalisada pela enzima DHQ desidrogenase, e a partir do ácido chiquímico (BENTLEY; HASLAM

1990; LEUSCHNER et al., 1995). Ao aplicar glyphosate em um vegetal, também ocorre um acúmulo de ácido quínico, devido ao acúmulo de compostos acima da EPSPS na rota (ORCARAY et al., 2010 e 2012, CARBONARI et al. 2014). Fato este também observado neste experimento e que corroboram com os obtidos por Gomes (2011) e Gomes et al. (2015) que constaram acúmulo de ácido quínico em plantas de milho após a aplicação de glyphosate.

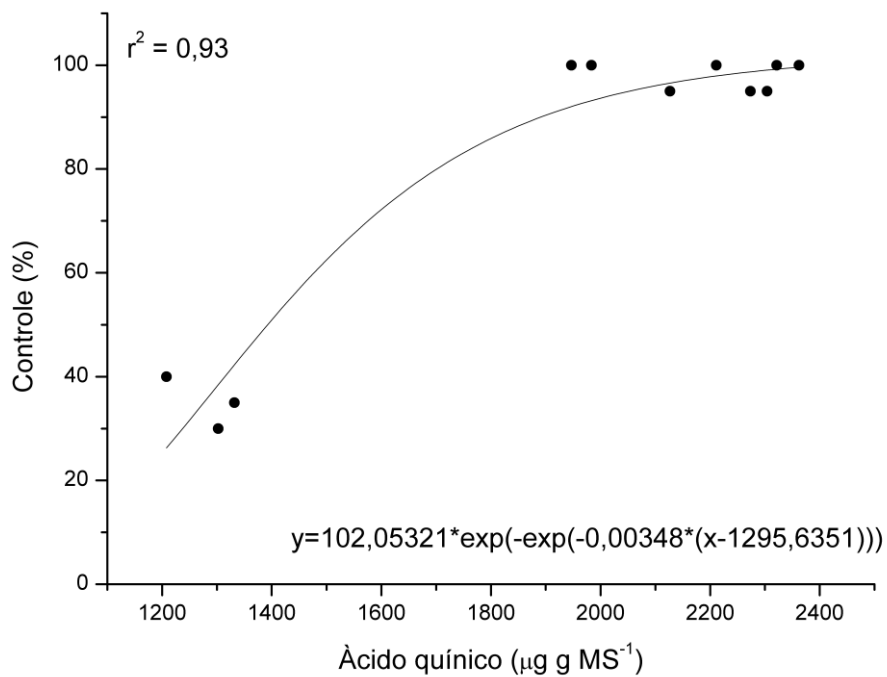


**Figura 9** — Acúmulo de ácido quínico em biótipos de *Digitaria insularis* 72 horas após a aplicação de glyphosate (HAA) e nas testemunhas não tratadas. As barras de erros correspondem a média do erro padrão (n=4) e letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Botucatu – SP, 2017

Para elucidar os resultados obtidos com a concentração de ácido chiquímico e quínico e a porcentagem de controle observada nos biótipos avaliados, os dados foram confrontados e estão apresentados nas Figuras 10 e 11. É possível verificar que a porcentagem de controle apresentou uma elevada correlação com o acúmulo de ácido chiquímico e quínico, sendo o  $r^2$  0,96 e 0,93, respectivamente, evidenciando que o acúmulo destes compostos podem ser utilizados como marcadores de plantas resistentes ao glyphosate.



**Figura 10** — Correlação entre a porcentagem de controle aos 28 dias após a aplicação (DAA) obtida no segundo teste de fitointoxicação e o acúmulo de ácido chiquímico 72 horas após a aplicação do glyphosate. Botucatu – SP, 2017



**Figura 11** — Correlação entre a porcentagem de controle aos 28 dias após a aplicação (DAA) obtida no segundo teste de fitointoxicação e o acúmulo de ácido quínico 72 horas após a aplicação do glyphosate. Botucatu – SP, 2017

Assim como observado neste experimento, diversos autores relataram a presença de biótipos de *D. insularis* resistente ao glyphosate em diversas regiões do país (ADEGAS et al., 2010; CORREIA et al., 2010; CARVALHO et al., 2012; MELO et al., 2012; REINERT et al., 2013; BARROSO et al., 2015; MARTINS et al., 2016).

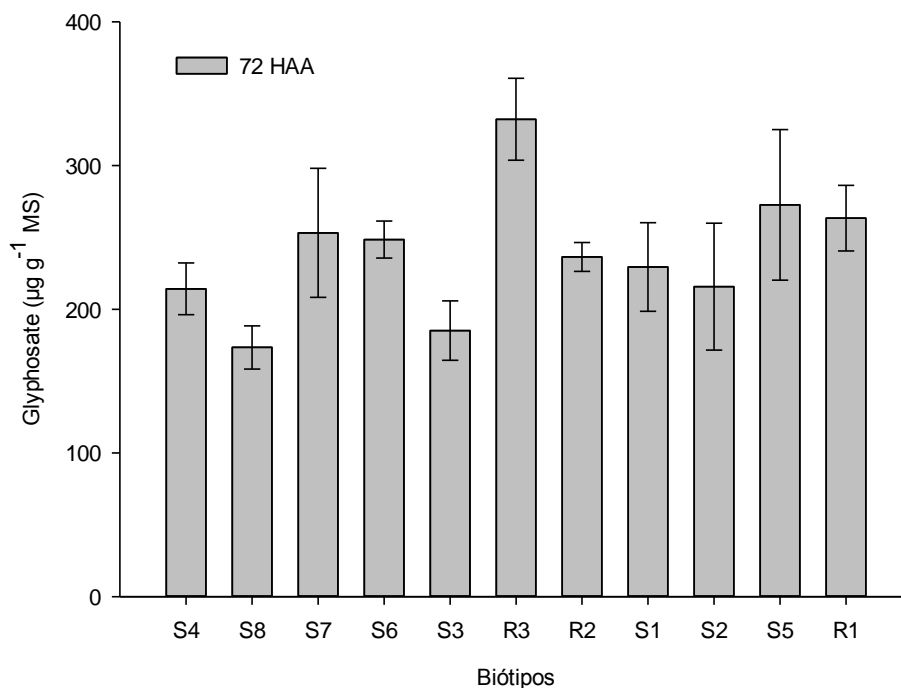
Quanto a deposição, absorção e translocação de glyphosate 72 HAA, os dados da análise de variância se encontram na Tabela 6.

**Tabela 6** — Resumo da análise de variância para os valores de deposição, absorção e translocação de glyphosate 72 horas após a sua aplicação. Botucatu – SP, 2017

<b>ANOVA</b>	<b>Deposição</b>	<b>Absorção</b>	<b>Translocação</b>
F	2,06 <sup>ns</sup>	1,65 <sup>ns</sup>	0,63 <sup>ns</sup>
CV(%)	25,56	55,93	179,82
DMS	148,92	21,93	1,00
ER	30,49	4,49	0,20

<sup>ns</sup> Não significativo. DMS – Diferença mínima significativa. ER – erro padrão. CV – Coeficiente de variação.

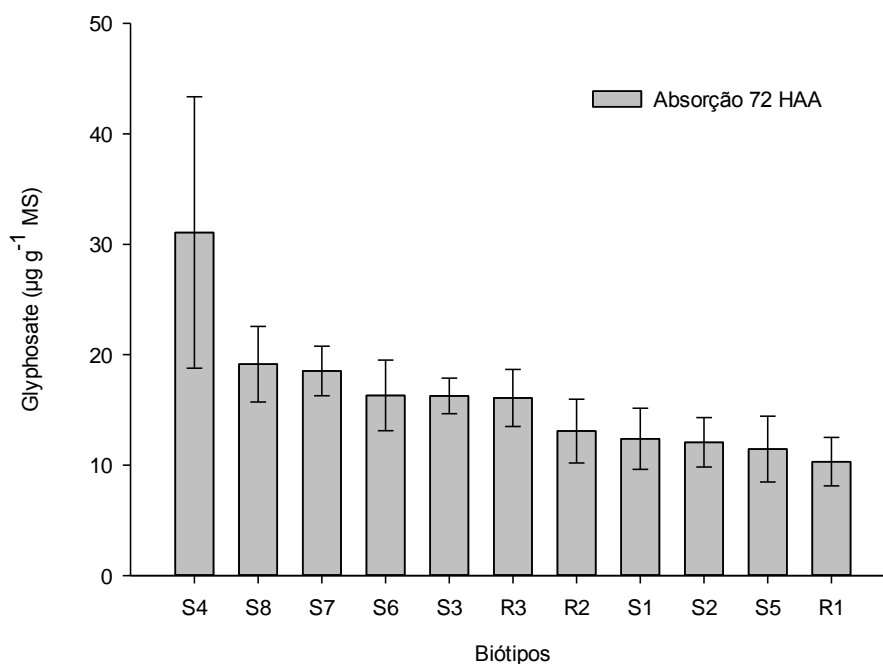
Houve a necessidade de se estudar a deposição de glyphosate nas parcelas, pois como as plantas foram obtidas através da propagação vegetativa, não foi possível padronizar adequadamente um estágio vegetativo para o momento da aplicação, desta forma, poderia haver discrepância na deposição do glyphosate em função das diferenças de tamanho na parte aérea destas plantas, embora visualmente tenham sido pouco evidenciadas. A Figura 12 comprova que não houve diferença significativa entre a deposição de glyphosate nas plantas avaliadas, ou seja, a quantidade do herbicida presente nas folhas foi semelhante para todos os biótipos e, portanto, as eventuais diferenças na formação de crescimento destas plantas não apresentaram variações na deposição.



**Figura 12** — Deposição de glyphosate quantificado com 72 horas após a aplicação (HAA) nas folhas dos perfilhos aplicados em onze biótipos de *Digitaria insularis*. As barras de erros correspondem a média do erro padrão (n=4). Botucatu – SP, 2017

Verificou-se também que não houve diferença estatística ao se quantificar a absorção de glyphosate 72 HAA em todos os biótipos avaliados (Figura 13). No entanto, notou-se que em média apenas 8% do glyphosate aplicado foi absorvido pelas plantas, independentemente dos biótipos serem resistentes ou sensíveis. Isso evidencia que este herbicida, mesmo em baixas concentrações na planta (em média  $16 \mu\text{g g}^{-1} \text{MS}$ ) é eficaz no controle de capim-amargoso suscetível, mesmo em plantas adultas.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Carvalho et al. (2012), que verificaram 72 HAA de glyphosate que não houve diferença na absorção do herbicida, entre plantas de capim-amargoso resistentes e suscetíveis, e que menos da metade do produto aplicado foi absorvido pelas folhas com 96 horas após a aplicação. Melo (2015) ao avaliar plantas de capim-amargoso também não evidenciou diferenças de absorção entre os biótipos suscetíveis e resistentes.

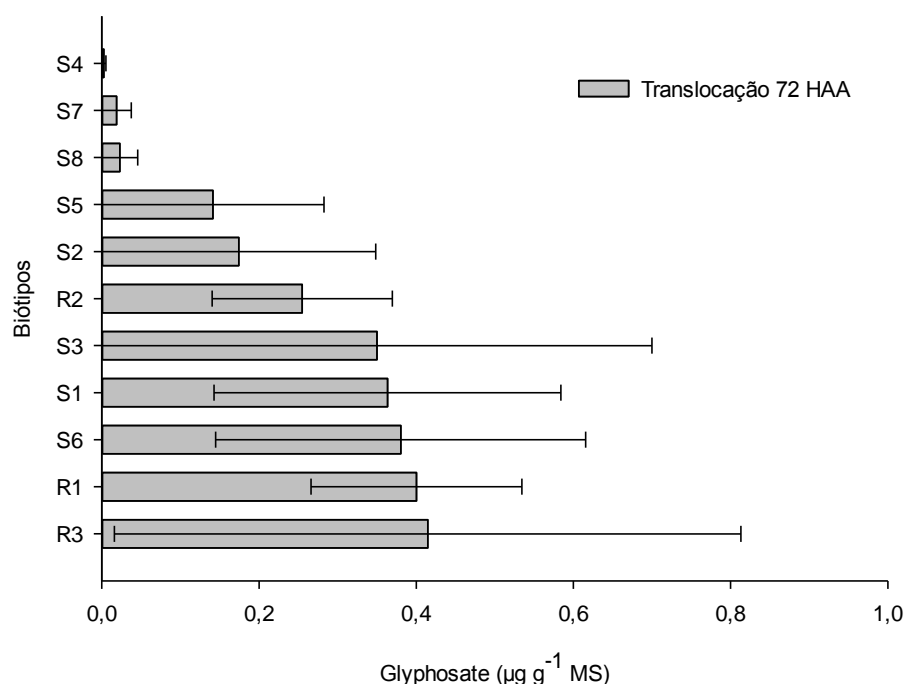


**Figura 13** — Absorção de glyphosate quantificado com 72 horas após a aplicação (HAA) nas folhas dos perfilhos aplicados em onze biótipos de *Digitaria insularis*. As barras de erros correspondem a média do erro padrão (n=4). Botucatu – SP, 2017

Após a absorção do herbicida, ele precisa translocar através de tecidos vasculares até os sítios de ação onde irá exercer sua atividade fitotóxica (SATICHIVI et al., 2000). A translocação do glyphosate foi reduzida entre os biótipos analisados, em torno de 1% do herbicida absorvido pelas folhas dos perfilhos que receberam a aplicação foi translocado para as folhas não tratadas, além disso, não houve diferença significativa entre as plantas resistentes e suscetíveis (Figura 14). Ainda, o coeficiente de variação observado para a translocação foi elevado, pois várias parcelas não apresentaram concentrações detectáveis de glyphosate no interior das folhas provenientes dos perfilhos protegidos no momento da aplicação.

Estes dados corroboram com os obtidos por Melo et al. (2012) e Melo (2015), que não verificaram diferenças na translocação de <sup>14</sup>C-glyphosate entre biótipos resistentes e suscetíveis. No entanto, de acordo com Carvalho et al. (2012), nas plantas resistentes maior parte do herbicida ficou retida nas folhas tratadas e menor quantidade translocou para outras partes da planta. Os autores sugerem que a translocação é considerada um dos mecanismos de resistência de *D. insularis* a glyphosate.





**Figura 14** — Translocação de glyphosate quantificado com 72 horas após a aplicação (HAA) nas folhas dos perfilhos não aplicados em onze biótipos de *Digitaria insularis*. As barras de erros correspondem a média do erro padrão (n=4). Botucatu – SP, 2017

Uma possível explicação para os dados de baixa translocação do glyphosate observados nos biótipos de capim-amargoso deste experimento, é que os rizomas formados têm grande quantidade de amido que serve de barreira e impede a translocação do herbicida, e ainda, atua como fonte de reserva permitindo que as plantas tratadas rebrotem rapidamente (MACHADO et al., 2008). Todavia, conforme observado na Figura 14, não houve diferença de translocação entre os biótipos resistentes e suscetíveis, isso sugere que a translocação pode não ser um mecanismo de resistência de *D. insularis* ao glyphosate e que mais estudos devem ser realizados.

O fato de o capim-amargoso possuir baixa translocação, independentemente de ser resistente ou suscetível, é um indicativo de que o glyphosate pode ser mais eficiente quando atua nas folhas, ou seja, a translocação para outras partes da planta como perfilhos e sistema radicular pode exercer pouca influência em seu controle. Isso explicaria os altos índices de controle observados nos biótipos suscetíveis (Figuras 6 e 7), mesmo com baixa absorção (Figura 13) e pouquíssima translocação do produto nas plantas (Figura 14). O biótipo suscetível S4, por exemplo, foi o que apresentou maior absorção de glyphosate nas folhas

provenientes dos perfilhos que receberam aplicação, no entanto, foi o biótipo que apresentou menor concentração de glyphosate translocado para as folhas dos perfilhos protegidos.

Outro mecanismo de resistência de *D. insularis* ao glyphosate proposto é a maior velocidade que estas plantas possuem em metabolizar este herbicida em AMPA, glioxilato e sarcosina. (CARVALHO et al. 2012). A Tabela 7 contempla os dados da análise de variância para o composto AMPA, principal metabólito do glyphosate, obtidos neste experimento.

**Tabela 7** — Resumo da análise de variância para ácido aminometilfosfônico (AMPA) analisado 72 horas após a aplicação de glyphosate. Botucatu – SP, 2017

ANOVA	AMPA
F	1,17 <sup>ns</sup>
CV(%)	158,61
DMS	0,15
ER	0,03

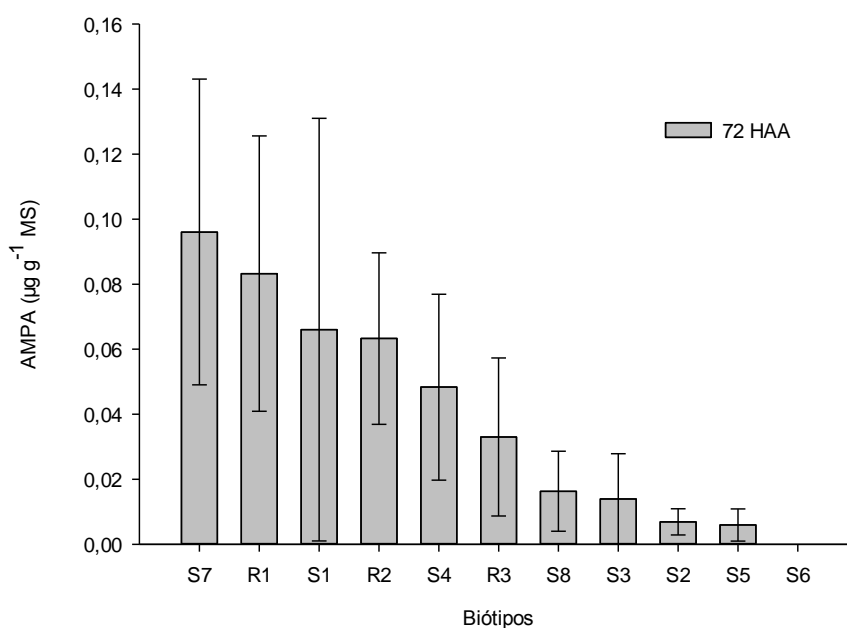
<sup>ns</sup> não significativo. DMS – Diferença mínima significativa. ER – erro padrão. CV – coeficiente de variação.

Não houve diferença significativa para metabolização do glyphosate em AMPA 72 HAA, entre os biótipos resistentes e suscetíveis. Além disso, menos de 1% do glyphosate encontrado dentro da planta foi transformado em AMPA (Tabela 8), evidenciando que a metabolização deste herbicida também não é considerada um mecanismo de resistência do capim-amargoso ao glyphosate. Ainda, no biótipo S6 não foi detectado a presença de AMPA, nos demais, a concentração variou entre 0,005 a 0,09  $\mu\text{g g}^{-1}$  MS (Figura 15). Em várias amostras não foi detectado a presença de AMPA e isso explica o motivo do alto valor encontrado para o coeficiente de variação (Tabela 7).

**Tabela 8** – Porcentagem relativa de glyphosate e ácido aminometilfosfônico (AMPA) 72 horas após a aplicação de glyphosate (HAA) em biótipos de *Digitaria insularis*. Botucatu – SP, 2017

Biótipos	Glyphosate	AMPA
S1	99,66	0,44
S2	99,94	0,06
S3	99,89	0,11
S4	99,85	0,15
S5	99,96	0,04
S6	100,00	0,00
S7	99,53	0,47
S8	99,93	0,07
R1	99,01	0,99
R2	99,50	0,50
R3	99,84	0,16
<hr/>		
*Média dos suscetíveis	99,84	0,16
**Média dos resistentes	99,45	0,55
<hr/>		
F	1,50 <sup>ns</sup>	1,50 <sup>ns</sup>
CV(%)	0,48	187,60
DMS	1,18	1,18
ER	0,24	0,24

<sup>ns</sup> não significativo. DMS – Diferença mínima significativa. ER – erro padrão. CV (%) coeficiente de variação. \*Biótipos S1 a S8; \*\*Biótipos R1 a R3.



**Figura 15** — Concentração total de ácido aminometilfosfônico (AMPA) 72 horas após a aplicação de glyphosate (HAA) nos biótipos de *Digitaria insularis*. As barras de erros correspondem a média do erro padrão (n=4). Botucatu – SP, 2017

Esses resultados não corroboram parcialmente com os obtidos por Carvalho et al. (2012), que verificaram que com 168 HAA, 80% do glyphosate foi encontrado no biótipo suscetível, enquanto que no resistente menos de 10%, ou seja, rápida metabolização do herbicida em plantas jovens e resistentes. Ainda de acordo com os autores, com 96 HAA, AMPA e sarcosina não foram detectados no biótipo suscetível, enquanto que nos resistentes foram encontrados entre 37 e 64% de AMPA e 15 a 32% de glioxilato. Carvalho et al. (2013) e Costa et al. (2014) também relataram mais rápida degradação de glyphosate pelas plantas jovens e resistentes. Vale ressaltar que neste experimento as plantas de *D. insularis* utilizadas estavam adultas e perenizadas e isso pode explicar, em parte, a diferença na metabolização em AMPA em comparação aos relatos citados.

Quando uma planta metaboliza rapidamente um herbicida, menor concentração de seu ingrediente ativo, que é responsável por causar fitotoxicidade, estará presente nos tecidos vegetais, conseqüentemente, a probabilidade de que esta planta morra é menor devido a baixa quantidade de herbicida inibindo a enzima alvo.

Com relação aos aminoácidos aromáticos, na Tabela 9 estão descritos os dados da análise de variância obtidos para fenilalanina, tirosina, triptofano e fenilalanina + tirosina + triptofano.

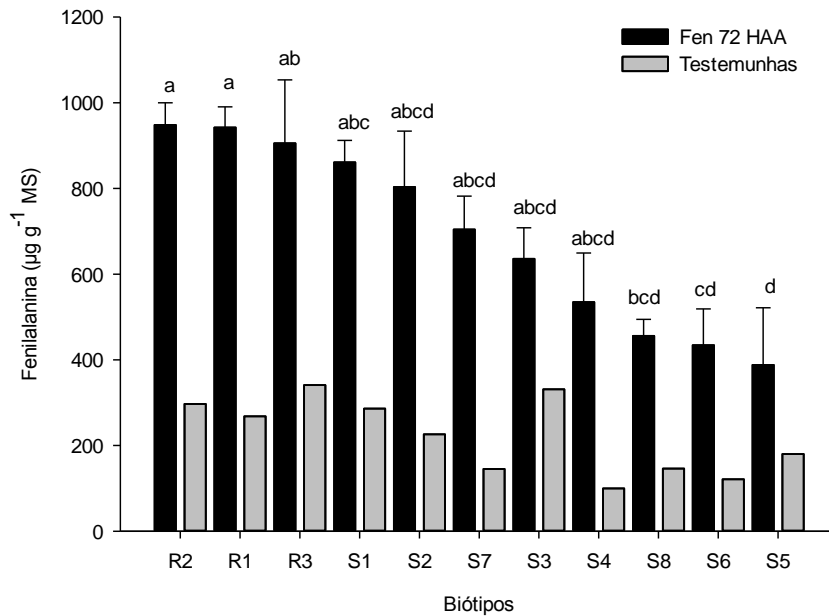
**Tabela 9** — Resumo da análise de variância para concentração dos aminoácidos aromáticos em *Digitaria insularis* analisados 72 horas após a aplicação de glyphosate (HAA). Botucatu – SP, 2017

ANOVA	Fenilalanina	Tirosina	Triptofano	F + T + T
F	5,16**	7,98**	4,57**	6,23**
CV(%)	27,22	31,57	15,68	23,32
DMS	459,97	320,50	152,50	857,67
ER	94,20	65,63	31,23	175,64

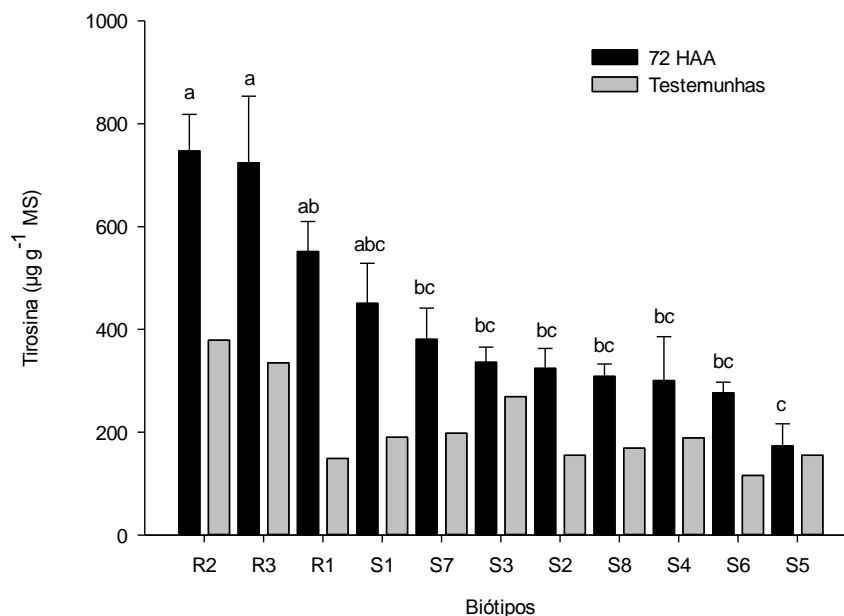
F + T + T – Fenilalanina + Tirosina + Triptofano. \* Significativo a 1 % pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. DMS – diferença mínima significativa; ER – erro padrão; CV – coeficiente de variação.

Esperava-se que após a aplicação de glyphosate ocorresse um decréscimo de fenilalanina, tirosina e triptofano, principalmente nos biótipos suscetíveis, pois, essa redução é o primeiro passo provocado pelo herbicida na rota do ácido chiquímico (COLE, 1985). Porém, essa redução não ocorre para todas as espécies de plantas (PETERSEN et al., 2007; MOLDES et al., 2008; GRAVENA et al., 2009). Fato este também observado neste experimento, ao invés de reduzir os aminoácidos houve

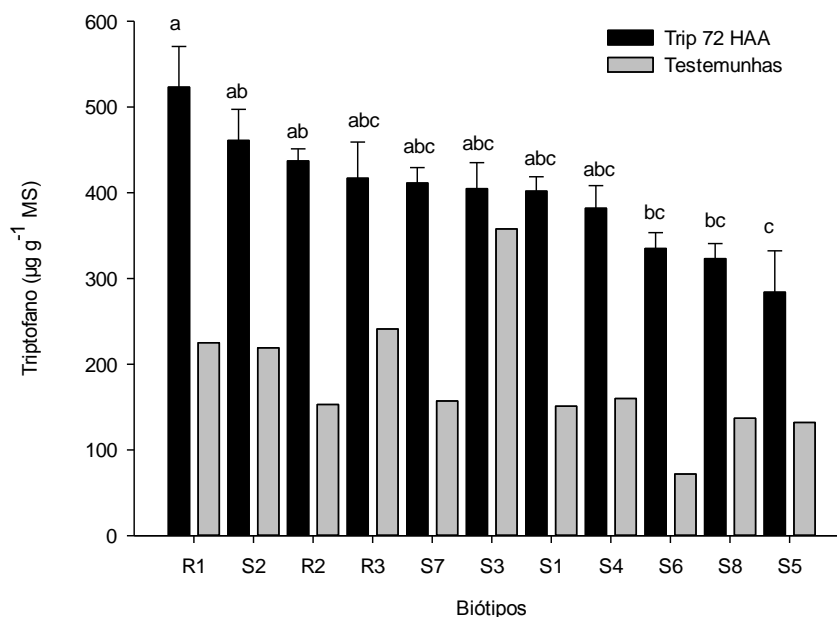
um aumento na concentração de fenilalanina, tirosina e triptofano após a aplicação do herbicida em todas as plantas avaliadas (Figuras 16, 17 e 18).



**Figura 16** — Concentração de fenilalanina 72 horas após a aplicação de glyphosate (Fen 72 HAA) nos biótipos de *Digitaria insularis* tratados e não tratados com o produto (testemunhas). As barras de erros correspondem a média do erro padrão (n=4) e letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Botucatu – SP, 2017



**Figura 17** — Concentração de tirosina 72 horas após a aplicação de glyphosate (Tir 72 HAA) nos biótipos de *Digitaria insularis* tratados e não tratados com o produto (testemunhas). As barras de erros correspondem a média do erro padrão (n=4) e letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Botucatu – SP, 2017



**Figura 18** — Concentração de triptofano 72 horas após a aplicação de glyphosate (Trip 72 HAA) nos biótipos de *Digitaria insularis* tratados e não tratados com o produto (testemunhas). As barras de erros correspondem a média do erro padrão (n=4) e letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Botucatu – SP, 2017

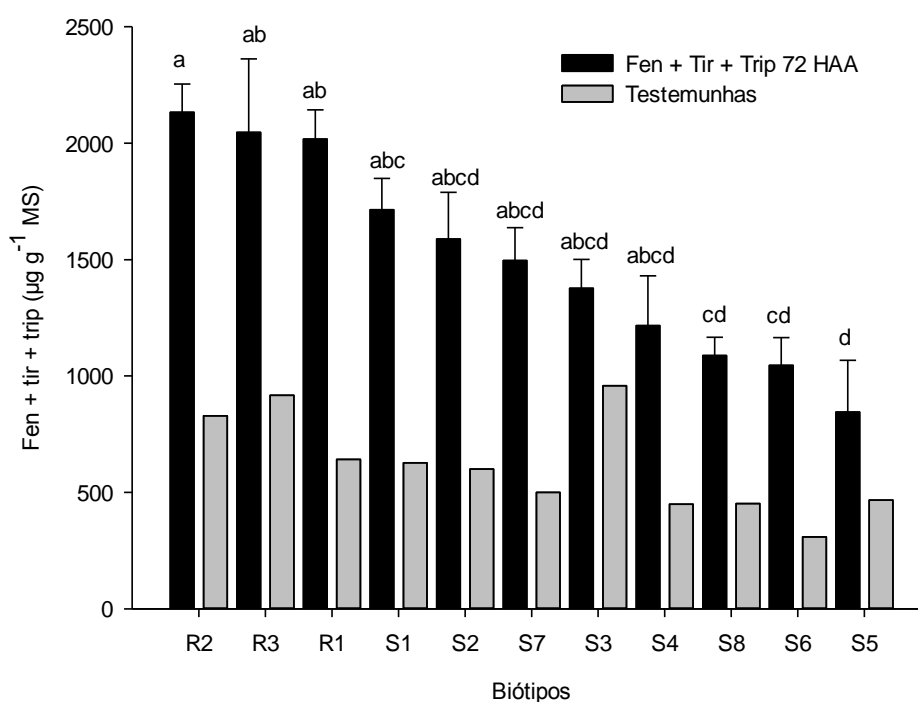
É possível observar também aumento significativo de fenilalanina e tirosina nos biótipos resistentes em comparação aos suscetíveis (Figuras 16,17). Já para o aminoácido triptofano, houve resposta significativa entre os biótipos avaliados, porém, não foi apenas para as plantas resistentes, como é o caso do S2 que apresentou concentrações semelhantes as observadas nas plantas resistentes R1 e R2 (Figura 18). Já R3, outro biótipo resistente, os teores de triptofano foram inferiores as demais plantas resistentes e semelhantes as demais suscetíveis, exceto para S6, S8 e S5, que apresentaram menores concentrações do aminoácido (Figura 18).

Resultados semelhantes foram encontrados por Petersen et al. (2007), que constaram aumento significativo na concentração de fenilalanina, quando a planta em estudo foi exposta a concentrações de 1 a 10 µM de glyphosate, no entanto ocorreu um decréscimo quando a planta foi submetida a concentrações superiores a 50 µM do mesmo herbicida. Os autores observaram resultados semelhantes para tirosina, e para o triptofano foi observado um aumento.

Contudo, Wang et al. (2001) investigaram o efeito do glyphosate no teor de aminoácidos aromáticos em plântulas de *Cyperus rotundus* e observaram que as concentrações de tirosina e fenilalanina, três dias após a exposição, não diferiram

significativamente da testemunha, e a concentração de triptofano foi significativamente maior em plântulas tratadas com glyphosate em comparação com a testemunha.

De modo geral, houve significativo aumento na concentração total dos aminoácidos aromáticos fenilalanina + tirosina + triptofano nos biótipos resistentes (R2, R3 e R1) em comparação aos suscetíveis, sendo que, os resistentes apresentaram em média  $2.065,66 \mu\text{g g}^{-1}$  MS da soma dos três aminoácidos, enquanto os suscetíveis apresentaram em média  $1.296,42 \mu\text{g g}^{-1}$  MS (Figura 19).



**Figura 19** — Concentração de fenilalanina + tirosina + triptofano 72 horas após a aplicação de glyphosate (Fen + Tir + Trip 72 HAA) nos biótipos de *Digitaria insularis* tratados e não tratados com o produto (testemunhas). As barras de erros correspondem a média do erro padrão ( $n=4$ ) e letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Botucatu – SP, 2017

Uma possível explicação para esse aumento dos aminoácidos aromáticos após o contato das plantas com o herbicida seria, alterações nas regulações metabólicas na biossíntese destes aminoácidos e hidrólise de proteínas. O glyphosate provoca uma desaceleração na produção de proteínas e, conseqüentemente, a procura de aminoácidos para a síntese proteica diminui e isso promove um aumento dos aminoácidos livres (ZOBIOLE et al. 2010). A menor concentração total dos aminoácidos aromáticos observada pode ter reduzido a produção de proteínas, e conseqüentemente, impediu o crescimento e desenvolvimento das plantas, até que

as mesmas estivessem mortas com o passar dos dias, como observado nos biótipos suscetíveis alvo deste estudo.

No entanto, o inverso pode ter ocorrido nos biótipos resistentes. Estas plantas podem ter acionado genes de resistência que potencialmente responderam aumentando a produção dos aminoácidos aromáticos, como forma de promover maior síntese proteica e/ou permitir a continuidade da produção de diversos metabólitos secundários e, assim, garantir a sua sobrevivência como fuga a ação do glyphosate.

Em complemento, Velini et al. (2009) afirmam que nem sempre é possível concluir que produtos distantes do sítio de ação do glyphosate (EPSPS) terão sua síntese bloqueada ou intensamente reduzida pela aplicação do herbicida, em função da presença de sistemas de controle da rota que podem compensar, ao menos em parte, a menor síntese de alguns dos compostos intermediários. Portanto, quanto menor o número de reações que separam um determinado composto de interesse até o sítio de ação, maior a probabilidade de que as concentrações do mesmo sejam reduzidas como resultado da aplicação do herbicida.

Complementando a importância dos aminoácidos aromáticos nas plantas, Rippert et al. (2004) verificaram que a rota do ácido chiquímico está ligada de forma indireta com um outro mecanismo de ação de herbicida, o metabólito ativo de isoxaflutole, que converte hidroxifenilpiruvato (produzido a partir do aminoácido tirosina) a homogentisato, um composto utilizado na produção de antioxidantes como a vitamina E. A atividade da enzima EPSPS está diretamente relacionada a acumulação de tirosina e vitamina E, que gera efeitos na tolerância ao estresse oxidativo e aumenta a resistência ao metabólito ativo de isoxaflutole (RIPPERT et al. 2004). Deste modo, os biótipos de capim-amargoso resistentes ao glyphosate podem, potencialmente, se tornarem também resistentes aos herbicidas derivados de isoxaflutole.

Com relação ao ácido salicílico, na Tabela 10 se encontram os dados da análise de variância para o composto analisado 72 HAA, em biótipos de capim-amargoso resistentes e suscetíveis.



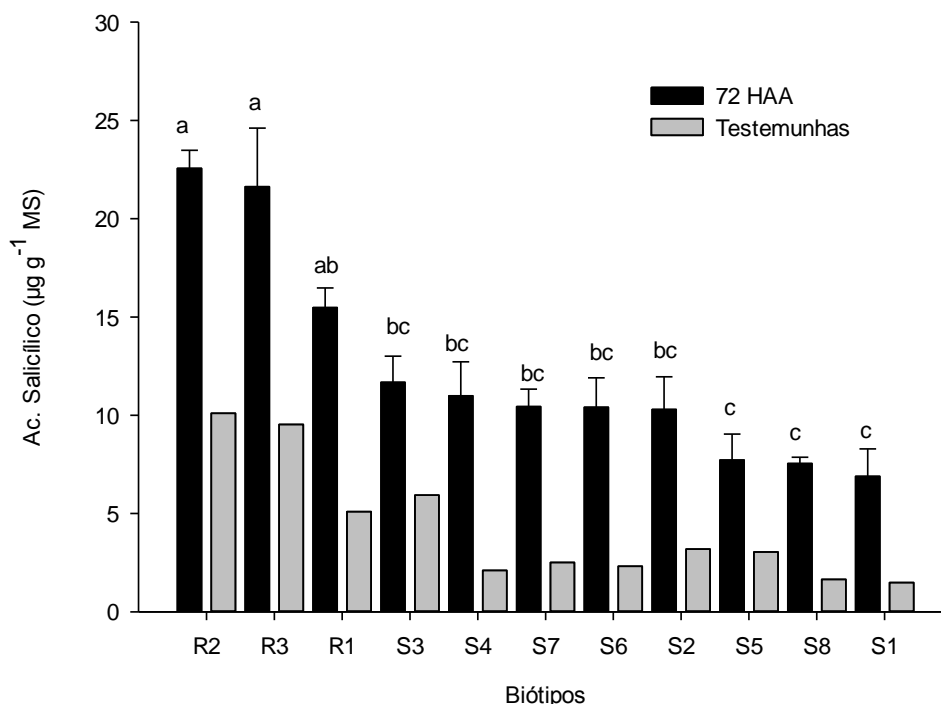
**Tabela 10** — Resumo da análise de variância para o composto ácido salicílico analisado 72 horas após a aplicação de glyphosate. Botucatu – SP, 2017

<b>ANOVA</b>	<b>Ácido Salicílico</b>
F	12,66**
CV(%)	24,48
DMS	7,37
ER	1,50

\*\*Significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey. DMS - diferença mínima significativa; ER - erro padrão; CV – coeficiente de variação.

Os biótipos resistentes, R2, R3 e R1, foram os que obtiveram maior concentração de ácido salicílico com a concentração variando entre 15 e 22  $\mu\text{g g}^{-1}$  MS (Figura 20). Além disso, ao observar as testemunhas, independente das plantas serem resistentes ou sensíveis ao herbicida, nota-se que estas plantas obtiveram valores inferiores de ácido salicílico, com concentrações variando de 1,49 a 10  $\mu\text{g g}^{-1}$  MS.

É possível observar ainda na Figura 20, que houve separação dos biótipos em três classes de concentração do composto, sendo R2; R3 e R1 como já descrito, os que obtiveram maiores concentrações, S3; S4; S7; S6 e S2 as plantas que apresentaram teores intermediários e S5; S8 e S1 os biótipos que apresentaram quantidades inferiores de ácido salicílico.



**Figura 20** — Concentração total de ácido salicílico 72 horas após a aplicação de glyphosate (HAA) nos biótipos de *Digitaria insularis* tratados e não tratados com o produto (Testemunhas). As barras de erros correspondem a média do erro padrão (n=4) e letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Botucatu – SP, 2017

O ácido salicílico é o principal composto sinalizador que está envolvido no acionamento de genes de resistência a patógenos, sua síntese em plantas está ligada a fenilalanina (WARD et al., 1991; RYALS et al., 1996; POPOVA et al., 1997; BUCHANAN et al., 2000; GAILLE et al., 2002). Após a detecção do estresse ou do agente causal, várias rotas metabólicas podem ser ativadas ou inibidas nas plantas e isso modifica toda a síntese e acumulação dos compostos como fenólicos e terpênicos (VELINI et al., 2009). Ainda, o pré tratamento com 500 µmol L<sup>-1</sup> de ácido salicílico em plântulas de cevada apresentaram efeitos positivos contra os danos oxidativos promovidos pelo herbicida paraquat (ANANIEVA et al., 2002).

O ácido salicílico pode ser benéfico para as plantas no ponto de vista de protegê-las contra patógenos, mas pode também ser prejudicial, pois pode limitar o crescimento destas por um processo autotóxico ou com gasto excessivo de energia, caso os genes de resistência acionados não sejam os corretos (VELINI et al., 2009).

Estas constatações sugerem estudar se o capim-amargoso resistente ao herbicida glyphosate pode ser mais tolerante ao ataque de patógenos. Essa informação é importante, pois o capim-amargoso resistente está presente em

praticamente todas as áreas produtoras de grãos do país e segundo Gonçalves et al. (2015) esta planta daninha é hospedeira da bactéria *Pantoea ananatis*, atribuída pelos autores como agente causal da mancha branca do milho, uma doença generalizada no território brasileiro e muito relevante para a cultura. Em complemento Ruuhola e Julkinen-Titto (2003) observaram que a produção de ácido salicílico e compostos fenólicos foram importantes para a resistência de *Salix petandra* a patógenos, porém, limitaram o crescimento das plantas estudadas.

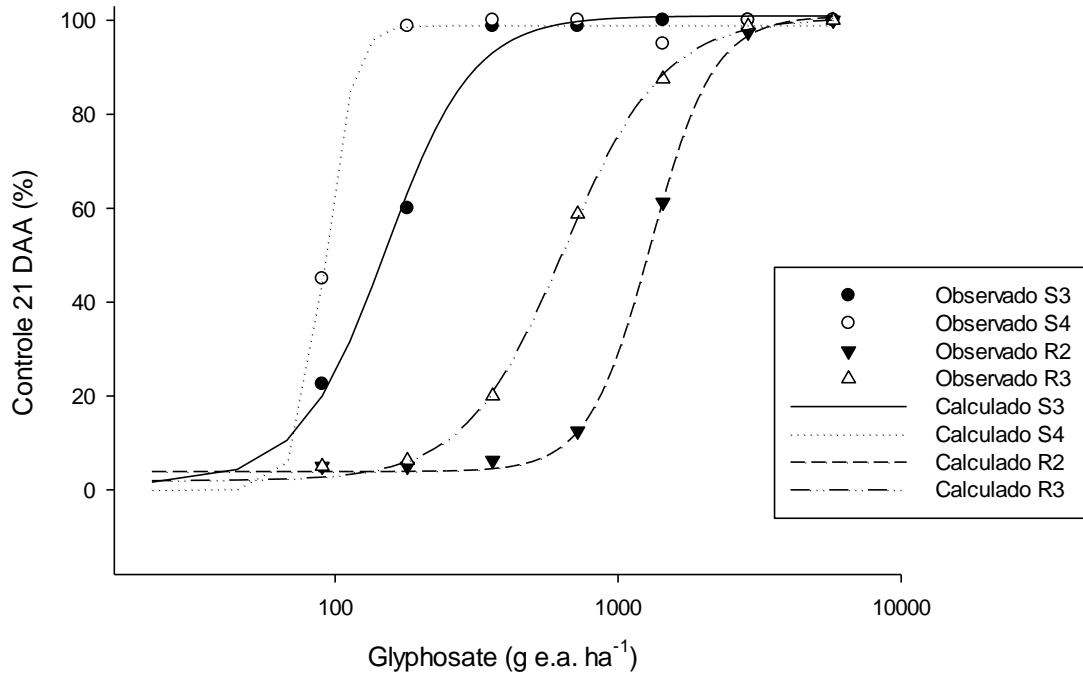
Esse maior acúmulo de ácido salicílico pode estar relacionado com custo adaptativo e ser um dos motivos que explicam os resultados de menor desenvolvimento inicial de capim-amargoso resistente ao glyphosate obtidos por Martins et al. (2016). No entanto, segundo os autores, a partir dos 30 dias após a emergência os biótipos resistentes crescem mais rapidamente que os suscetíveis, chegando ao florescimento por volta dos 72 dias após a emergência. O custo de adaptação pode ser positivo ou negativo para a espécie, dependendo do alelo de resistência relacionado (DÉLYE et al., 2013). Um exemplo são os biótipos de *Lolium rigidum* suscetíveis ao glyphosate, os quais apresentam maior capacidade competitiva que os biótipos resistentes (FERREIRA et al., 2008). Já o azevém que tem a resistência causada pelo aumento do metabolismo mediado por P450, apresenta menores taxas de crescimento relativo e assimilação líquida, bem como, menor capacidade de competição.

#### **4.2 Curvas de dose-resposta em biótipos de capim-amargoso**

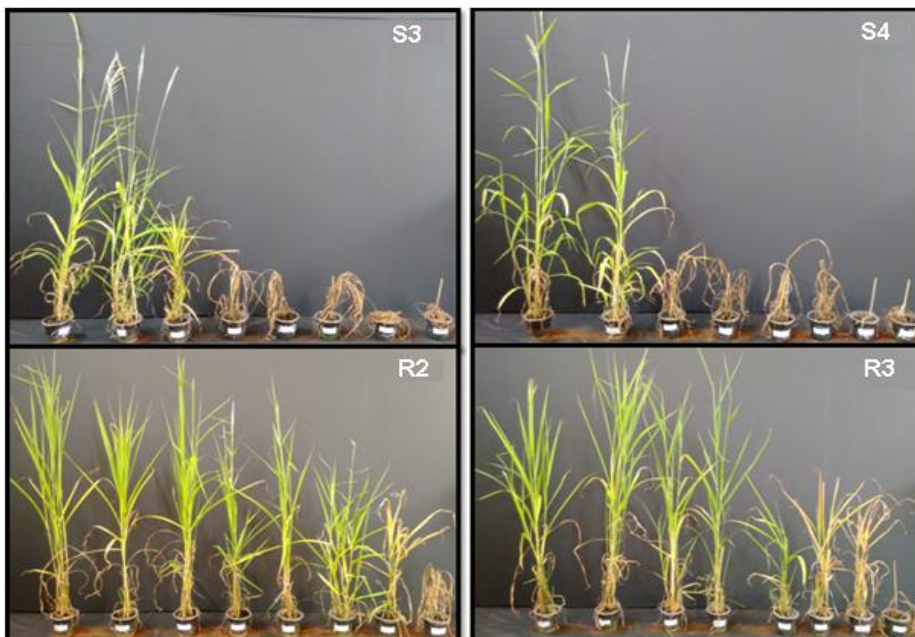
Observa-se que nos biótipos S3 e S4 a dose de 180 g e.a. ha<sup>-1</sup> de glyphosate foi suficiente para obter controle de 98 e 60%, respectivamente, enquanto que nos biótipos R2 e R3, esta mesma dose proporcionou apenas 5 e 6% de controle, respectivamente (Figura 21).

A dose comercial de glyphosate recomendada para controle de capim-amargoso varia de 540 a 1440 g e.a. ha<sup>-1</sup>, sendo a dose maior para plantas adultas e perenizadas, e a menor para plantas jovens. No caso deste experimento, as plantas foram obtidas por sementes e não estavam perenizadas e apresentavam 40 a 60 cm de comprimento com 4 a 6 perfilhos, não sendo consideradas plantas jovens e nem adultas, portanto, adotou-se 720 g e.a. ha<sup>-1</sup> como a dose comercial. Para essa

concentração os biótipos S3 e S4 apresentaram 100% de controle, enquanto que o R2 e R3 apresentaram 12 e 58% de controle, respectivamente, e só atingiram 100% com 5760 g e.a. ha<sup>-1</sup> (Figura 21). A Figura 22 ilustra os resultados encontrados.

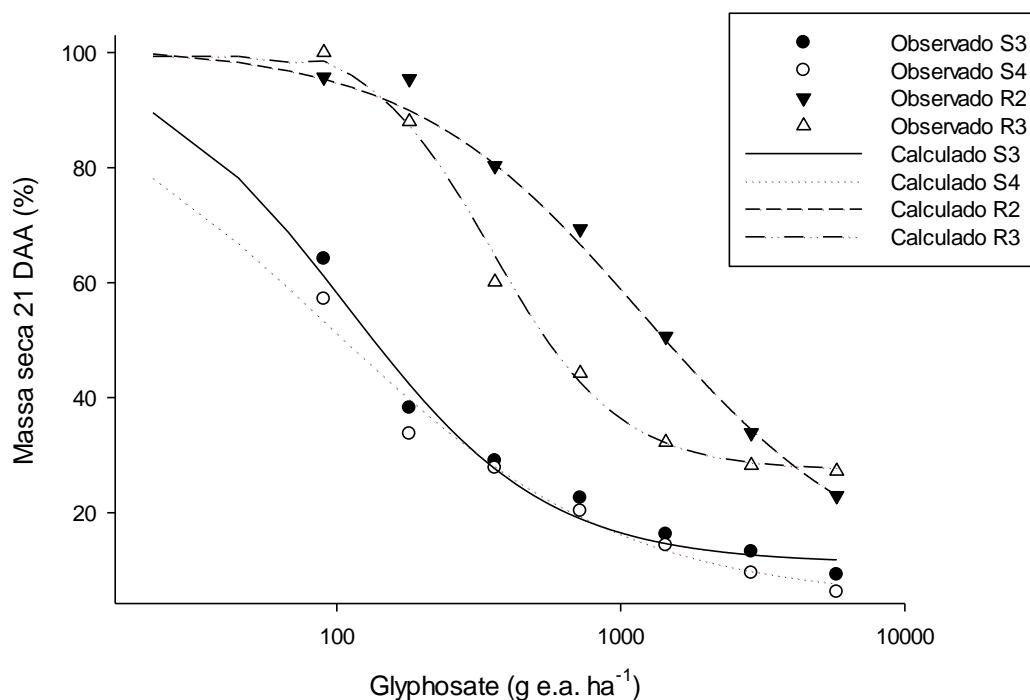


**Figura 21** — Porcentagem de controle para os biótipos S3, S4, R2 e R3 submetidos a diferentes doses de herbicida glyphosate aos 21 dias após a aplicação (DAA). O gráfico se encontra em escala logarítmica. Botucatu – SP, 2017



**Figura 22** — Fotos da porcentagem de controle para os biótipos S3, S4, R2 e R3 submetidos as doses respectivas de 0, 90, 180, 360, 720, 1440, 2880 e 5760 g e.a ha<sup>-1</sup> de glyphosate aos 21 dias após a aplicação (DAA). Botucatu – SP, 2017

Quanto a redução de massa seca os biótipos S3 e S4, na dose comercial recomendada obtiveram em torno de 80% de redução, enquanto que os biótipos R2 e R3 apenas 27 e 54%, respectivamente (Figura 23).



**Figura 23** — Massa seca (%) para os biótipos S3, S4, R2 e R3 submetidos a diferentes doses de herbicida glyphosate aos 21 dias após a aplicação (DAA). O gráfico se encontra em escala logarítma. Botucatu – SP, 2017

De acordo com o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), os resultados de porcentagem de controle e redução no teor de massa seca evidenciaram ajustes elevados e, portanto, adequados ao modelo proposto por Seefeldt et al. (1995) (Tabelas 8 e 9). Ao determinar os valores de  $EC_{50}$  e/ou  $GR_{50}$  tem-se o fator de resistência ( $FR=R/S$ ) que corresponde ao número de vezes em que a dose necessária para controlar ou reduzir a massa seca em 50% na população resistente é superior a dose necessária para se obter os mesmos resultados na população suscetível (CHRISTOFFOLETI e LÓPEZ-OVEJERO, 2008). Tem-se a confirmação da resistência quando o fator R/S for superior a 1,0 (SAARI et al., 1994).

Neste experimento os valores de  $EC_{50}$  encontrados para os biótipos foram 150; 91; 1308 e 644 g e.a. ha<sup>-1</sup> para S3, S4, R2 e R3, respectivamente (Tabela 11). Já para os valores de  $GR_{50}$  os resultados encontrados foram semelhantes, sendo 108; 93; 1190 e 351 g e.a. ha<sup>-1</sup> para a mesma sequência descrita dos biótipos (Tabela 12). Com posse destes dados foi calculado o fator de resistência, sendo que para a

porcentagem de controle esse número foi de 14,37 e 7,07 vezes para os biótipos R2 e R3, respectivamente, e para a redução de massa seca foi de 12,79 e 3,77 vezes para os biótipos R2 e R3, respectivamente, confirmando a resistência nas progênes destes biótipos (Tabelas 11 e 12).

**Tabela 11** — Estimativas dos parâmetros da curva *a*, *b* *c* e *d*, coeficiente de determinação ( $r^2$ ) do modelo log-logístico e coeficiente de variação (CV%) para os biótipos jovens de *Digitaria insularis* em relação a porcentagem de controle aos 21 DAA. Botucatu – SP, 2017

Variável	Biótipos	CV(%)	a	B	c (EC <sub>50</sub> )	d	r <sup>2</sup>	FR*
Controle (%)	S3	18,38	1,20	99,73	150 ± 12,64 ER	-2,82	0,95	1,64
	S4	26,42	6,29	98,99	91 ± 11,87 ER	-8,91	0,95	-
	R2	32,81	3,89	97,04	1308 ± 11,05 ER	-3,91	0,96	14,37
	R3	25,60	1,95	98,58	644 ± 11,22 ER	-2,45	0,98	7,07

DAA (Dias após a aplicação); EC<sub>50</sub> (valores expressos em g e.a. ha<sup>-1</sup> de glyphosate);

ER = erro padrão da média. Equação do modelo:  $y=(a+b/((1+(x/c)^d))$ ;

\* Fator de Resistência = EC<sub>50</sub> R / EC<sub>50</sub> S

**Tabela 12** — Estimativas dos parâmetros da curva *a*, *b* *c* e *d*, coeficiente de determinação ( $r^2$ ) do modelo log-logístico e coeficiente de variação (CV%) para os biótipos jovens de *Digitaria insularis* em relação a porcentagem de massa seca aos 21 DAA. Botucatu – SP, 2017

Variável	Biótipos	CV(%)	a	b	c (GR <sub>50</sub> )	d	r <sup>2</sup>	FR*
Massa seca (%)	S3	28,66	11,17	89,40	108 ± 9,87 ER	1,24	0,93	1,16
	S4	57,41	4,85	95,40	93 ± 17,59 ER	0,84	0,95	-
	R2	15,99	101,17	-97,10	1190 ± 10,87 ER	-1,05	0,94	12,79
	R3	24,39	27,44	76,24	351 ± 15,68 ER	1,93	0,97	3,77

DAA (Dias após a aplicação); GR<sub>50</sub> (valores expressos em g e.a. ha<sup>-1</sup> de glyphosate);

ER = erro padrão da média. Equação do modelo:  $y=(a+b/((1+(x/c)^d))$ ;

\* Fator de Resistência = GR<sub>50</sub> R / GR<sub>50</sub> S

Antes do relato oficial de resistência do capim-amargoso ao herbicida glyphosate no Brasil em 2008 (HEAP, 2017), Lacerda e Victoria Filho (2004) verificaram que a dose necessária para reduzir em 50% a massa seca desta espécie foi de apenas 93,6 g e.a. ha<sup>-1</sup>, corroborando com os dados obtidos neste experimento para os biótipos suscetíveis (Tabela 12).

Já em 2010, quando a resistência estava se disseminando pelo país, Adegas et al. (2010) verificaram que foram necessários 1.249,2 g e.a. ha<sup>-1</sup> de glyphosate para se obter os mesmos valores de GR<sub>50</sub> e para Correia et al. (2010), 1.724,4 g e.a. ha<sup>-1</sup>, estando de acordo com os valores obtidos neste experimento (Tabela 12).

Posteriormente, diversos casos de resistência de *D. insularis* ao glyphosate tem sido e continuam sendo relatados em todo país como descrevem Reinert et al. (2013) que evidenciaram a necessidade de 1.732,26 g e.a. ha<sup>-1</sup> para se obter GR<sub>50</sub>, Melo et al. (2015) que constataram que doses entre 456,33 e 1.030,89 g e.a. ha<sup>-1</sup> foram necessárias para reduzir em 50% a quantidade de massa seca, Licorini et al. (2015), que verificaram a necessidade de doses de glyphosate acima de 1.437,68 g.e.a. ha<sup>-1</sup> para obter os mesmos GR<sub>50</sub>, Barroso et al. (2015) que constataram valores de 394,24 g e.a. ha<sup>-1</sup> de glyphosate para GR<sub>50</sub>, e recentemente, Martins et al. (2016) evidenciaram que o GR<sub>50</sub> só foi alcançado com doses acima de 300 g e.a. ha<sup>-1</sup> de glyphosate, também comprovando a resistência do capim-amargoso ao glyphosate.

O grau de resistência evidenciado nos biótipo R3 é considerado baixo, pois segundo o Comitê de ação à resistência de plantas daninhas a herbicidas, para ser considerado alto precisa ser maior ou igual a dez (Heap, 2016), fato este observado no biótipo R2. Todavia, estão de acordo com Adegas et al. (2010) que evidenciaram FR = 6,46 para a população de capim-amargoso resistente a glyphosate e Barroso et al. (2015) que constaram o FR = 2,36, ambos também para *D. insularis* e glyphosate.

Quando uma população apresenta fator de resistência elevado, não restam dúvidas de que ela seja resistente (CARVALHO; CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2009). Porém, o caso precisa ser analisado com critério, pois, o que pode ser considerado alto fator de resistência para um herbicida pode ser considerado baixo para outro. No caso dos herbicidas inibidores da ALS, ACCase e inibidores do fotossistema II por exemplo, os fatores de resistência relatados são altíssimos, frequentemente maiores que 100 (GRESSEL, 2000). Já para o glyphosate, o fator de resistência geralmente é abaixo de 10. Sendo assim, a progênie dos biótipos R2 e R3 podem ser consideradas resistentes ao glyphosate.

Normalmente, quando o fator de resistência é acima de dez, os mecanismos que conferem resistência da planta ao herbicida podem ser múltiplos, principalmente se a espécie for de polinização cruzada (SAMMONS; GAINES, 2014). Carvalho et al. (2012) verificaram que a absorção inicial mais lenta, bem como a menor translocação, a metabolização do glyphosate em AMPA, glioxilato e sarcosina, e duas alterações de aminoácidos na posição 182 e 310 da EPSPS (alteração de prolina por treonina e tirosina por cisteína, respectivamente) foram os responsáveis

pela resistência do capim-amargoso ao glyphosate. Todavia, parcialmente, não corroboram com os resultados encontrados no segundo experimento desta dissertação, pois não foram evidenciadas diferenças na absorção, translocação e metabolismo em AMPA, como já mencionadas (Figuras 13; 14 e 15).

Em complemento aos relatos de mutações obtidas por Carvalho et al. (2012), foram evidenciados que pelo menos dois alelos encontrados são facultativos de resistência e que nem todas as plantas resistentes apresentam treonina, porém, cisteína pareceu ser essencial para conferir resistência em *D. insularis* (GALEANO et al., 2016). Estes últimos autores concluíram ainda que houve maior atividade enzimática e expressão gênica, porém, sem ligação com as alterações de aminoácidos encontradas.

Diante dos fatos, ao se analisar o coeficiente de variação obtido com as plantas propagadas vegetativamente nos testes de fitointoxicação por glyphosate (Tabela 4), é possível observar que os valores foram inferiores aos encontrados neste experimento (Tabelas 11 e 12), evidenciando a importância de se trabalhar com a propagação vegetativa. O capim-amargoso produz milhares de sementes por ciclo e, com isso, tem-se grande variação nos experimentos executados com plantas obtidas por sementes. Isso explica, em parte, as diferenças nos relatos encontrados em literatura e ao não consenso da comunidade científica sobre quais são os reais mecanismos de resistência do capim-amargoso ao herbicida glyphosate.



## 5 CONCLUSÕES

O método de reprodução, vegetativo ou por sementes, não alterou o comportamento relativo dos genótipos nos testes de controle com glyphosate.

O glyphosate elevou os teores de ácido quínico e ácido chiquímico em genótipos suscetíveis de *Digitaria insularis*.

Os teores de ácido quínico e chiquímico após a aplicação de glyphosate podem indicar a suscetibilidade ou resistência de genótipos de *Digitaria insularis* a glyphosate.

Os genótipos resistentes apresentaram concentrações mais elevadas de ácido salicílico após aplicação de glyphosate.

A metabolização de glyphosate em AMPA não é considerada um mecanismo de resistência de *D. insularis* ao glyphosate.

Os genótipos resistentes ao glyphosate apresentaram fator de resistência de 14,37 e 7,04 para EC<sub>50</sub> e 12,79 e 3,77 para GR<sub>50</sub>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, R. M. S. C. G. **Validação de metodologia de análise de pesticidas agrícolas em águas por LC/MS**. 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Química)- Universidade do Porto, Faculdade de Engenharia (FEUP), Porto, 2008.

AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. **Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas no Brasil**. Passo Fundo: Ed. Berthier, 2009. 352 p.

ADEGAS, F. S. et al. Alternativas de controle químico de *Digitaria insularis* resistente ao herbicida glyphosate. In: XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, 2010, Bandeirantes - PR. **Anais...** Ribeirão Preto, SP: SBCPD, 2010. p. 756-760.

ADU-YEBOAH, P. et al. Reduced Glyphosate Translocation in Two Glyphosate-Resistant Populations of Rigid Ryegrass (*Lolium rigidum*) from Fence Lines in South Australia. **Weed Science**, Cambridge, Inglaterra, v. 62, n. 01, p. 4-10, mar. 2014.

ANANIEVA, E. A.; ALEXIEVA, V. S.; POPOVA, L. P. Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. **Journal of plant physiology**, v. 159, p. 685-693, 2002.

BLATCHLEY, W. S. **The Indiana weed book**. Indianapolis, EUA: The Nature Publishing Company, 1912. 192 p.

BOERBOOM, C. M. Nonchemical options for delaying weed resistance to herbicides in Midwest cropping systems. **Weed Technology**, v. 13, p. 636-642, 1999.

BENTLEY, R; HASLAM, E. The shikimate pathway: a metabolic tree with many branches. **Critical Reviews Biochemistry and Molecular Biology**, Madison, v. 25, n. 5, p. 307-384, 1990.

BUHLER, D. D.; BURNSIDE, D. E. Effect of spray components of glyphosate toxicity to annual grasses. **Weed Science**, Champaign, v. 31, n. 1, p. 124-130, 1983.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. 3rd ed. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367 p.

BARROSO, A. A. M. et al. Does Sourgrass leaf anatomy influence glyphosate resistance? **Comunicata Scientiae**, v. 6, n. 4, p. 445-453, 29 dez. 2015.

BOSTAMAM, Y. et al. Rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) populations containing a target site mutation in EPSPs and reduced glyphosate translocation are more resistant to glyphosate. **Weed Science**, Lawrence, v. 60, n. 3, p. 474-479, 2012.

BOUDET, A. M.; GRAZIANA, A.; RANJEVA, R. Recent advances in the regulation of the prearomatic pathway. In: VAN SUMERE, C. F.; LEA, P. J. (Eds.). **Annual proceedings of the Phytochemical Society of Europe**. Oxford: Clarendon Press, v. 25, p. 135-159, 1985.

BRANDÃO, M. et al. Plantas daninhas no estado do Rio de Janeiro: acréscimo aos trabalhos já efetuados no estado. **Planta Daninha**, v. 13, n. 2, p. 98-116, 1995.

BRIGHENTI, A. M. et al. Cadastramento fitossociológico de plantas daninhas na cultura do girassol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 5, p. 651-657, 2003.

BUEHRING, N. W.; MASSEY, J. H.; REYNOLDS, D. B. Shikimic acid accumulation in fieldgrown corn (*Zea mays*) following simulated glyphosate drift. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 55, n. 3, p. 819-824, 2007.

CARVALHO, L. B. **Plantas daninhas**. Edição do autor: Lages, SC, 2013. 82 p.

COLE, D. J. Mode of action of glyphosate - a literature analysis. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, p. 48-74, 1985.

COUPLAND, D. Metabolism of glyphosate in plants. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. **The herbicide glyphosate**. London: Butterworth, p. 25-33, 1985.

CARVALHO, S. J. P.; NICOLAI, M. **Problemática do capim-amargoso em áreas agrícolas brasileiras**. Hrac – BR: encarte técnico, Paulinea, SP, 2016.

CARVALHO, S. L.; PITELLI, R. A. Levantamento e análise fitossociológica das principais espécies de plantas daninhas de pastagens da região de Selvíria (MS). **Planta Daninha**, v. 10, n. 1/2, p. 25-32, 1992.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P. J. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Piracicaba: HRAC-BR, 2008. 120 p.

CARBONARI, C. A. et al. Glyphosate effects on sugarcane metabolism and growth. **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 5, n. 24, p. 3585-3593, 2014.

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

CARVALHO, S. J. P.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. F. Métodos para a comprovação da resistência de plantas daninhas a herbicidas. In: AGOSTINETTO D.; VARGAS, L. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Passo Fundo: Berthier, 2009. p. 103-122.

CARVALHO, L. B. et al. Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 615-622, 2012.

CARDINALI, V. C. B. et al. Shikimate accumulation, glyphosate absorption and translocation in Horseweed biotypes. **Planta Daninha**, v. 33, n. 1, p. 109-118, 2015.

CASTRO, P. R. C.; FERREIRA, S. O.; YAMADA, T. **Ecofisiologia da produção agrícola**. Piracicaba: POTAFOS, 1987. 249 p.

CHACHALIS, D.; REDDY, K. N.; ELMORE, C. D. Characterization of leaf surface, wax composition, and control of redvine and trumpetcreeper with glyphosate. **Weed Science**, v. 49, n. 2, p. 156-163, 2001.

CHRISTOFFOLETI, P. J. et al. Resistência de plantas daninhas a herbicidas: termos e definições. In: **Aspectos da resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Hrac – BR, Piracicaba, 4 ed, 2016. 262 p.

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

CORREIA, N. M.; LEITE, G. J.; GARCIA, L. D. Resposta de Diferentes Populações de *Digitaria insularis* ao Herbicida Glyphosate. **Planta Daninha**, v. 28, n. 4, p. 769-776, 2010.

COSTA, F. R. et al. The intensity of on-target site mechanisms influences the level of resistance of sourgrass to glyphosate. **Communications in plant sciences**, v. 4, n. 1-2, p. 11-17, 2014.

DYER, W. E. Resistance to glyphosate. In: POWLES, S. B.; HOLTUM, J. A. M. **Herbicide resistance in plants**. Boca Raton: CRC press, p. 229-241, 1994.

DELLA-CIOPPA, G. et al. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, Washington, DC, v. 83, p. 6973-6877, 1986.

DE MARIA, N. et al. New insights on glyphosate mode of action in nodular metabolism: role of shikimate accumulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2621-2628, 2006.

DÉLYE, C. et al. A new insight into arable weed adaptive evolution: mutations endowing herbicide resistance also affect germination dynamics and seedling emergence. **Annals of Botany**, v. 111, p. 681-691, 2013.

DEVINE, M. D.; DUKE, S. O.; FEDTKE, C. **Physiology of herbicide action**. New Jersey: P T R Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1993. 441 p.

DUKE, S. O.; CERDEIRA, A. L.; MATALLO, M. B. Uso de herbicidas e seus efeitos em doenças vegetais. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 115, p. 1-4, 2006.

ESCHENBURG, S. et al. How the mutation glycine96 to alanine confers glyphosate insensitivity to 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. **Planta**, New York, v. 216, p. 129-135, 2002.

FAO – Food and agriculture organization of the United nations. **Guidelines on efficacy evaluation for the registration of plant protection products**. International code of conduct on the distribution and use of pesticides. FAO, 2006. 61 p.

FENG, J. C. et al. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Coryza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. **Weed Science**, Champaign, v. 52, p. 498-505, 2004.

FERREIRA, E. A. et al. Potencial competitivo de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*). **Planta Daninha**, v. 26, p. 261-269, 2008.

FRAGA, D. et al. Biologia e genética das plantas daninhas resistentes a herbicidas no Brasil. In: **Aspectos da resistência de plantas daninhas a herbicida**, Hrac, Piracicaba: Esalq, 4 ed, 2016. 262 p.

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

FUNKE, T. et al. Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation thr97 → lle and pro101 → ser in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 284, n. 15, p. 9854- 9860, 2009.

GALI, A. J. B. A molécula glyphosate e a agricultura brasileira. In: VELINI, E. D. et al. **Glyphosate**. Botucatu: FEPAF, 2009. 496 p.

GOMES, G. L. G. C. **Alterações metabólicas de plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito**. 2011. 97 f. Dissertação (Mestrado em

Agronomia /Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

GRESSEL, J. Molecular biochemistry of resistance that have evolved in the field. In: GRESSEL, J. **Molecular biology of weed control**. London: Taylor & Francis, 2000. p. 122- 218.

GEIGER, R. D.; BESTMAN, H. D. Self-limitation of herbicide mobility by phytotoxic action. **Weed Science**, Champaign, v. 38, n. 3, p. 324-329, 1990.

GOMES JUNIOR, J. R.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Biologia e manejo de plantas daninhas em área de plantio direto. **Planta daninha**, v. 26, n. 4, p. 789-798, 2008.

GOUGLER, J. A.; GEIGER, D. R. Carbon partitioning and herbicide transport in glyphosate-treated sugarbeet (*Beta vulgaris*). **Weed Science**, Champaign, v. 32, n. 5, p. 546-551, 1984.

GRUYS, K. J.; SIKORSKI, J. A. Inhibitors of tryptophan, phenylalanine and tyrosine biosynthesis as herbicides. In: SINGH, B. K. **Plant amino acids: biochemistry and biotechnology**. New York: Marcel Dekker, p. 357-384, 1999.

GAILLE, C.; KAST, P.; HAAS, D. Salicylate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Purification and characterization of PchB, a novel bifunctional enzyme displaying isochorismate pyruvate-lyase and chorismate mutase activities. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 277, n. 24, p. 21768-21775, 2002.

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

GAINES, T. A. et al. Interspecific hybridization transfers a previously unknown glyphosate resistance mechanism in *Amaranthus* species. **Evolutionary Applications**, Malden, v. 5, p. 29-38, 2012.

GALEANO, E. et al. EPSPS variability, gene expression, and enzymatic activity in glyphosate-resistant biotypes of *Digitaria insularis*. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, p. 2-15, 2016.

GAZZIERO, D. L. P. et al. Efeitos da convivência do capim-amargoso na produtividade da soja. In: Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, 28, Campo Grande, **Anais...** p. 345-350, 2012.

GE, X. et al. Application of <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy to glyphosate studies in plants: insights into cellular uptake and vacuole sequestration correlated to herbicide resistance. In: KOBAYASHI, D.; WATANABE, E. Handbook on herbicides: biological activity, classification and health & environment implications. New York: **Nova Science Publishers**, p. 55-84, 2013.

GE, X. et al. Glyphosate-resistant horseweed made sensitive to glyphosate: low-temperature suppression of glyphosate vacuolar sequestration revealed by  $^{31}\text{P}$  NMR. **Pest Management Science**, v. 67, n. 10, p. 1215-1221, 2011.

GEIGER, D. R.; KAPITAN, S. W.; TUCCI, M. A. Glyphosate inhibits photosynthesis and allocation of carbon to starch in sugar beet leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 82, n. 2, p. 468-472, 1986.

GEIGER, D. R.; TUCCI, M. A.; SERVIATES, J. C. Glyphosate effects on carbon assimilation and gas exchange in sugar beet leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, n. 2, p. 365-369, 1987.

GIMSING, A. L.; BORGGAARD, O. K.; BANG, M. Influence of soil composition on adsorption of glyphosate and phosphate by contrasting Danish surface soils. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 55, p. 183-191, 2004.

GOMES, G. L. G. C. et al. Extraction and simultaneous determination of glyphosate, AMPA and compounds of the shikimic acid pathway in plants. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 33, n. 2, p. 295-304, 2015.

GONÇALVES, R. M. et al. *Digitaria horizontalis* and *D. insularis* as alternative hosts for *Pantoea ananatis* in brazilian maize fields. **Journal of plant pathology**, v. 97, n. 1, p. 177-181, 2015.

GONZALEZ-TORRALVA, F. et al. Differential susceptibility to glyphosate among the *Conyza* weed species in Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4361-4366, 2010.

GRAVENA, R. et al. Low glyphosate rates do not affect *Citrus limonia* (L.) osbeck seedlings. **Pest Management Science**, London, v. 65, n. 4, p. 420-425, 2009.

HEAP, I. A. **Criteria for confirmation of the herbicide-resistant weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/Documents/ResistanceCriterion.pdf>>. Acesso em: 15 jul. 2016.

HEAP, I. A. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org>>. Acesso em: 27 abr. 2017.

HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, p. 347-369, 1989.

HARRING, T.; STREIBIG, J. C.; HUSTED, S. Accumulation of shikimic acid: A technique for screening glyphosate efficiency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 46, p. 4406-4412, 1998.

HALL, L. M.; STROME, K. M.; HORSMAN, G. P. Resistance to acetolactate synthase inhibitors and quinclorac in a biotype of false clover (*Gallium spurium*). **Weed Science**, v. 46, p. 390-396, 1998.

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

KISSMANN, K. G. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Disponível em: <[http://www.hrac-br.com.br/arquivos/texto\\_resistencia\\_herbicidas.doc](http://www.hrac-br.com.br/arquivos/texto_resistencia_herbicidas.doc)>. Acesso em: 01 jan. 2003.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira, p. 675-678. Tomo I, 1997.

KRUSE, N. D.; TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A. Herbicidas inibidores da EPSPS: Revisão de literatura. **Revista brasileira de herbicidas**, v. 1, n. 2, 2000.

KUVA, M. A. et al. Padrões de infestação de comunidades de plantas daninhas no agroecossistema de cana-crua. **Planta Daninha**, v. 26, n. 3, p. 549-557, 2008.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 3 ed, 2000. 720 p.

LACERDA, A. L. S.; VICTORIA FILHO, R. Curvas dose-resposta em espécies de plantas daninhas com o uso do herbicida glyphosate. **Bragantia**, v. 63, n. 1, p. 73-79, 2004.

LEE, L. J.; NGIM, J. A first report of glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica* (L) Gaertn) in Malaysia. **Pest Management Science**, London, v. 56, n. 4, p. 336-339, 2000.

LYDON, J.; DUKE, S. O. Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 36, p. 813-818, 1988.

LEUSCHNER, C.; HERRMANN, K. M.; SCHULTZ, G. The metabolism of quinate in pea roots: purification and partial characterization of a quinate hydrolyase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 319-325, 1995.

LI, R. et al. Genetic diversity of wild oat (*Avena fatua*) populations from China and the United States. **Weed Science**, v. 55, p. 95-101, 2007.



LICORINI, L. R. et al. Identificação e controle de biótipos resistentes de *Digitaria insularis* (L.) Fedde ao glyphosate. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 14, n. 3, p. 141-147, 2015.

LIU, S. H. et al. Absorption and translocation of glyphosate in aspen (*Populus tremuloides*) as influenced by droplet size, droplet number and herbicide concentration. **Weed Science**, Champaign, v. 44, n. 3, p. 482-488, 1996.

LÓPEZ-OVEJERO, R. et al. Frequency and dispersal of glyphosate-resistant sourgrass (*Digitaria insularis*) populations across brazilian agricultural production áreas. **Weed Science**, v. 65, n. 2, p. 285-294, 2017.

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

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

MADSEN, K. H.; JENSEN, J. E. **Meeting and training on risk analysis of HRCSS and exotic plants**. In: Curso sobre análise de risco da introdução de cultivares exóticas e plantas daninhas resistentes aos herbicidas. Piracicaba: ESALQ-USP, 1998.

MAXWELL, B. D.; MORTIMER, A. M. Selection for herbicide resistance. In: POWLWES, S. B.; HOLTUR, J. A. M. **Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry**. Boca Raton, EUA: Lewis, p.1-26, 1994.

MAYER, A. C.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. Oxford: Pergamon Press, 4 ed, 1989. 270 p.

MERVOSH, T. L.; BALKE, N. E. Effects of calcium, magnesium, and phosphate on glyphosate absorption by cultured plant cells. **Weed Science**, Champaign, v. 39, n. 3, p. 347-353, 1991.

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

MACHADO, A. F. L. et al. Análise de crescimento de *Digitaria insularis*. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 641-647, 2006.

MACHADO, A. F. L. et al. Caracterização anatômica de folha, colmo e rizoma de *Digitaria insularis*. **Planta Daninha**, v. 26, n. 1, p. 1-8, 2008.

MARÍA, N. et al. New insights on glyphosate mode of action in nodular metabolism: role of shikimate accumulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 54, p. 2621-2628, 2006.

MARTINS, J. F. M. et al. Planta growth and genetic polymorphism in glyphosate-resistant sourgrass (*Digitaria insularis* L. Fedde). **Australian journal of crop Science**, v. 10, n. 10, p. 1466-1473, 2016.

MATALLO, M. B. et al. Microwave-assisted solvent extraction and analysis of shikimic acid from plant tissues. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, p. 987-994, 2009.

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

MELO, M. S. C. et al. Alternativas para o controle químico de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao glyphosate. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 11, n. 2, p. 195-203, 2012.

MELO, M. S. C. et al. Herança genética da resistência de capim-amargoso ao glyphosate. **Revista brasileira de herbicidas**, v. 14, n. 4, p. 296-305, 2015.

MENDONÇA, S. G. et al. Ecofisiologia da germinação de sementes de *Digitaria insularis* (L.) Fedde. **Revista ciência agronômica**, v. 45, n. 4, p. 823-832, 2014.

MICHITTE, P. et al. Mechanisms of resistance to glyphosate in ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. **Weed Science**, Lawrence, v. 55, n. 5, p. 435-440, 2007.

MOLDES, C. A. et al. Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warszawa, v. 30, n. 4, p. 469-479, 2008.

MONDO, V. H. V. et al. Efeitos da luz e temperatura na germinação de sementes de quatro espécies de plantas daninhas do gênero *Digitaria*. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1, p. 131-137, 2010.

MONQUERO, P. A. et al. Absorção, translocação e metabolismo de glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. **Planta daninha**, Viçosa, MG, v. 22, n. 3, p. 445-451, 2004.

NANDULA, V. K. et al. Glyphosate-resistant and susceptible soybean (*Glycine max*) and canola (*Brassica napus*) dose response and metabolism relationship with glyphosate. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 9, p. 3540-3545, 2007.

NANDULA, V. K. et al. Glyphosate tolerance mechanism in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) from Mississippi. **Weed Science**, Lawrence, v. 56, n. 3, p. 344-349, 2008.

O'BRIEN, M. C.; PRENDEVILLE, G. N. Effect of herbicides on cell membrane permeability in *Lemna minor*. **Weed Research**, v. 19, p. 331-334, 1979.

OLIVEIRA, A. R.; FREITAS, S. P. Levantamento fitossociológico de plantas daninhas em áreas de produção de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 26, n. 1, p. 33-46, 2008.

ORCARAY, L. et al. Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide glyphosate. **Journal of Plant Physiology**, Toronto, v. 169, n. 1, p. 27-33, 2012.

ORCARAY, L. et al. The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. **Pest Management Science**, New York, v. 66, p. 262-269, 2010.

PYON, J. Y. **Studies on the biology of sourgrass (*Trichachne insularis*) (L.) Nees and of its competition with buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.) and guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.)**. 1975. 133 f. University of Hawaii (Thesis Doctor of Philosophy in agronomy and Soil Science), Hawaii, 1975.

PRESTON, C. **Threat from herbicide resistant weeds**. Disponível em: <[www.grdc.com.au/growers/res\\_upd/hirain/02/1longford\\_spring2002](http://www.grdc.com.au/growers/res_upd/hirain/02/1longford_spring2002)>. Acesso em: 01 mai. 2003.

PEREIRA, F. A. R.; VELINI, E. D. Sistemas de cultivo no cerrado e dinâmica de populações de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 21, n. 3, p. 355-363, 2003.

POWLES, S. B.; PRESTON, C. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. **Weed Technology**, Lawrence, v. 20, n. 2, p. 282-289, 2006.

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

PETERSEN, I. L. et al. Metabolic effects in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings after root exposure to glyphosate. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 89, p. 220-229, 2007.

POPOVA, L.; PANCHEVA, T.; UZUNOVA, A. Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role. **Bulgarian Journal Plant Physiology**, Sofia, v. 23, n. 1/2, p. 85-93, 1997.

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

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em <<http://www.r-project.org>>, 2008. Acesso em 02 jan. 2017.

REINERT, S. C. **Aspectos da biologia da *Digitaria insularis* resistente ao herbicida glyphosate**. 2013. 52 f. Dissertação de mestrado em Agronomia – fitotecnia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2013.

RODRIGUES, J. D. **Absorção e transporte de solutos nas plantas**. In: VELINI, E. D. et al. Glyphosate. Botucatu: Fepaf, 2009. 493 p.

READE, J. P. H.; COBB, A. H. Herbicides: modes of action and metabolism. In: NAYLOR, R.E.L. **Weed management handbook**. Blackwell Science: Oxford, p. 134-170, 2002.

RUUHOLA, T.; JULKINEN-TITO, R. Trade-off between synthesis of salicylates and growth of micropropagated *Salix petandra*. **Journal Chemistry Ecology**, New York, v. 29, n. 7, p. 1565-1588, 2003.

REDDY, K. N.; BELLALLOUI, N.; ZABLOTOWICZ, R. M. Glyphosate effect on shikimate, nitrate reductase activity, yield, and seed composition in corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 58, p. 3646-3650, 2010.

REDDY, K. N.; RIMANDO, A. M.; DUKE, S. O. Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 52, p. 5139-5143, 2004.

REDDY, K. N. et al. Aminomethylphosphonic acid accumulation in plant species treated with glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 56, p. 2125-2130, 2008.

REINERT, S. C.; PRADO, A. B. C. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Curvas de dose-resposta comparativas entre os biótipos resistente e suscetível de capim-amargoso ao herbicida glyphosate. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 12, n. 3, p. 260-267, 2013.

RIPPERT, P. et al. Engineering plant Shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, p. 92-100, 2004.

RYALS, J. A. et al. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1809-1819, 1996.

SHANER, D. L. Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. **Weed Science**, Lawrence, v. 57, n. 1, p. 118-123, 2009.

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

SAMMONS, R. D.; GAINES, T. A. Glyphosate resistance: state of knowledge. **Pest Management Science**, London, v. 70, n. 9, p. 1367-1377, 2014.

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

SINGH, B. K.; SHANER, D. L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, Champaign, v. 12, p. 527-530, 1998.

SAARI, L. L.; COTTERMAN, J. C.; THILL, D. C. **Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides**. In: POWLES, S. B.; HOLTUM, J. A. M. Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry. Boca raton: p. 83-139, 1994.

SATICHIVI, N. M. et al. Absorption and translocation of glyphosate isopropylamine and trimethy sulfonium salts in *Abutilon theophrasti* and *Setaria faberi*. **Weed Science**, v. 48, n. 6, p. 675-679, 2000.

SEEFELDT, S. S.; JENSEN, S. E.; FUERST, E. P. Loglogistic analysis of herbicide dose response relationship. **WeedTechnology**, v. 9, p. 218-227, 1995.

SERVIATES, J. C.; TUCCI, M. A.; GEIGER, D. R. Glyphosate effects on carbon assimilation, ribulose biphosphate carboxylase activity, and metabolite levels in sugar beet leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, n. 2, p. 370-374, 1987.

SHIEH, W. J.; GEIGER, D. R.; SERVIATES, J. C. Effect of N-(Phosphonomethyl) glycine on carbon assimilation and metabolism during a simulated natural day. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, n. 3, p. 1109-1114, 1991.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 3 ed, 2004. 719 p.

VARGAS, R. **Herbicide resistance**. The University of Arizona. Disponível em: <<http://ag.arizona.edu/crops/pesticides/papers/herbresis.html>>. Acesso em: 02 abril. 2003.

VIDAL, R. A. **Herbicidas: mecanismos de ação e resistência de plantas**. Porto Alegre: Ribas Vidal, 1997. 165 p.

VARGAS, L.; BORÉM, A.; SILVA, A. A. Herança da resistência aos herbicidas inibidores da ALS em biótipos da planta daninha *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, v. 19, n. 3, p. 331-336, 2001.

VAUGHN, K. C.; DUKE, S. O. Biochemical basis of herbicide resistance. **Chemistry of Plant Protect**, New York, v. 7, p. 141-169, 1991.

VÁZQUEZ-YANES, C.; OROZCO-SEGOVIA, A. Patterns of seed longevity and germination in the tropical rainforest. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, n. 1, p. 69-87, 1993.

VIDAL, R. A.; FLECK, N. G. Análise do risco da ocorrência de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas. **Planta Daninha**, v. 15, n. 12, p. 152-161, 1997.

VELINI, E. D. et al. Modo de ação do glyphosate. In: VELINI, E.D. et al. **Glyphosate**. Botucatu: FEPAF, 2009. 496 p.

VILA-AIUB, M. M. et al. Glyphosate resistance in *Sorghum halepense* and *Lolium rigidum* is reduced at suboptimal growing temperatures. **Pest Management Science**, London, v. 69, n. 2, p. 228-232, 2013.

WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Lignin biosynthesis. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 1001-1013, 1995.

WAKELIN, A. M.; LORRAINE-COLWILL, D. F.; PRESTON, C. Glyphosate resistance in four different populations of *Lolium rigidum* is associated with reduced translocation of glyphosate to meristematic zone. **Weed Research**, Oxford, v. 44, n. 6, p. 453-459, 2004.

WANG, C. Y. et al. Effect of glyphosate on aromatic amino acid metabolism in purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). **Weed Technology**, Champaign, v. 15, p. 628-635, 2001.

WARD, E. R. et al. Coordinate gene activity in response to agents than induce systems acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 3, p. 1085-1094, 1991.

XAVIER, E. **Mecanismos de resistência e resposta aos herbicidas inibidores da ALS e da PROTOX em *Euphorbia heterophylla* L.** 2014. 211 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.

YAMADA, T.; CASTRO, P. R. C. **Efeitos do glifosato nas plantas: Implicações fisiológicas e agrônômicas**. International plant nutrition institute. Encarte técnico, informações agrônômicas, n. 119, setembro de 2007.

YU, Q. et al. Distinct non-target site mechanism endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. **Planta**, New York, v. 230, n. 4, p. 713-723, 2009.

ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. Impact of glyphosate and *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis; with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. **Journal of Environmental Quality**, v. 33, p. 825-831, 2004.

ZOBIOLE, L. H. S. et al. Uso de aminoácido exógeno na prevenção de injúrias causadas por glyphosate na soja RR. 2010. In: JAWORSKI, E. G. Mode of action of N-phosphonomethylglycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 20, p. 1195-1198, 1972.