



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



JHONATAN DIEGO CAVALIERI

**RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES DE *Digitaria insularis* (L). Fedde A  
HERBICIDAS: FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA E INTERAÇÕES ENTRE  
FORMULAÇÕES DE GLYPHOSATE E ADJUVANTES**

BOTUCATU-SP

2017



JHONATAN DIEGO CAVALIERI

**RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES DE *Digitaria insularis* (L). Fedde A  
HERBICIDAS: FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA E INTERAÇÕES ENTRE  
FORMULAÇÕES DE GLYPHOSATE E ADJUVANTES**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientador: Prof. Dr. Carlos Gilberto Raetano

Coorientador: Prof. Dr. Caio Antonio Carbonari

BOTUCATU-SP

2017

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

C377r Cavalieri, Jhonatan Diego, 1987-  
Resistência de populações de *Digitaria insularis* (L).  
Fedde a herbicidas: frequência de ocorrência e interações  
entre formulações de glyphosate e adjuvantes / Jhonatan  
Diego Cavalieri. - Botucatu: [s.n.], 2017  
101 p.: il., grafs., tabs.

Tese(Doutorado) - Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2017  
Orientador: Carlos Gilberto Raetano  
Coorientador: Caio Antonio Carbonari  
Inclui bibliografia

1. Resistência a herbicidas. 2. Erva daninha. 3. Pul-  
verização. 3. Tecnologia de aplicação. I. Raetano, Carlos  
Gilberto. II. Carbonari, Caio Antonio. III. Universidade  
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de  
Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

Elaborada por Maria Lúcia Martins Frederico - CRB-8:5255

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

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO: "RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES DE *Digitaria insularis* (L). Fedde A HERBICIDAS: FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA E INTERAÇÕES ENTRE FORMULAÇÕES DE GLYPHOSATE E ADJUVANTES"

**AUTOR: JHONATAN DIEGO CAVALIERI**

**ORIENTADOR: CARLOS GILBERTO RAETANO**

**COORIENTADOR: CAIO ANTONIO CARBONARI**

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



Prof. Dr. CARLOS GILBERTO RAETANO  
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu



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



Prof. Dr. MARCELO DA COSTA FERREIRA  
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



PROFESSOR ASSOCIADO PEDRO JACOB CHRISTOFFOLETI  
Departamento de Produção Vegetal / ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ - USP



Prof. Dr. RUBEM SILVERIO DE OLIVEIRA JUNIOR  
Depto. Agronomia / Universidade Estadual de Maringá

Botucatu, 31 de julho de 2017.



*Dedico*

*Aos meus pais, Cidinês Cavaliéri e Tereza Geraldi de Lima, por todo apoio, incentivo, compreensão e confiança em todos os momentos desta e de outras etapas importantes de minha formação.*



## **AGRADECIMENTOS**

Em especial, a DEUS, por me iluminar e proporcionar forças e sabedoria o suficiente para enfrentar todas as dificuldades que a mim são confiadas.

Ao amigo, orientador, Professor Dr. Carlos Gilberto Raetano, pela oportunidade, paciência, confiança, companheirismo e valiosos ensinamentos científicos e profissionais.

Ao amigo, coorientador, Professor Dr. Caio Antonio Carbonari, pelas contribuições fundamentais ao desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e especialmente aos professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia (Proteção de Plantas), pela oportunidade de realização do curso de doutorado e por todos os ensinamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela concessão de bolsa de estudos durante o período do curso.

Ao meu irmão, Sidnei Douglas Cavalieri, pela amizade, companheirismo, incentivo e por todos os conselhos.

Aos amigos e companheiros de trabalho do laboratório de Tecnologia de Aplicação de Produtos Fitossanitários, Danilo Rodrigues, Diego Miranda, Felipe Matheus Souza e Santos, Luciano Del Bem Júnior, Matheus Mereb Negrisoni, Laryssa Moreira Bernardes e Patrick da Silva, pela ajuda na realização deste trabalho e por todos os bons momentos de convivência.

Aos amigos, Dieimisson Paulo Almeida, Fabiano Greisang, Edicarlos Castro, Fábio Henrique Krechinski, Renan Nascentes, Samuel Santos, Paulo Simino, Victor Cesco e Vitor Anunciato, pela contribuição na realização de etapas fundamentais para a realização desse trabalho.

Aos professores, Dr. Edivaldo Domingues Velini, Dr. Francisco André Ossamu Tanaka e Dr. Marcelo Costa Ferreira, pela disponibilidade na utilização de estruturas laboratoriais.

E, por fim, a todos aqueles que contribuíram de alguma maneira na execução desse trabalho, ficam aqui os meus sinceros agradecimentos.



## RESUMO

O conhecimento da resistência das plantas daninhas a herbicidas, em especial do capim-amargoso (*Digitaria insularis* L.) e a tecnologia de aplicação são aspectos fundamentais para recomendações de manejo da espécie daninha, e melhoria da performance do uso dos herbicidas. A pesquisa teve por objetivos estudar: (i) a sensibilidade de populações de capim-amargoso (*D. insularis* L.) aos herbicidas glyphosate e chethodim (ii); os processos pelos quais a tecnologia de aplicação, em particular as formulações de herbicida e os adjuvantes podem contribuir para a otimização do controle de *D. insularis* e, (iii) a influência destes fatores na absorção e metabolismo de *D. insularis* suscetível e resistente ao herbicida. Para isso, 62 populações de capim-amargoso foram coletadas nos estados do Paraná e São Paulo, sendo a maior parte delas provenientes de lavouras de soja transgênica, tolerante ao glyphosate. Ensaios *screening* foram conduzidos para determinar a sensibilidade das populações de capim-amargoso aos herbicidas por meio de estudos de curvas de frequência de respostas. Com esses dados foram selecionadas populações de capim-amargoso resistentes e suscetíveis aos herbicidas para determinação do nível de resistência por meio de estudos de curva dose-resposta, em diferentes estádios da planta. Posteriormente realizaram-se ensaios para comparar formulações de glyphosate e adjuvantes sobre variáveis de tecnologia de aplicação. Nestes ensaios, duas formulações de glyphosate (WG e SL) e cinco combinações (sem adjuvante, óleo mineral, óleo vegetal metilado, aquil ester etoxilado e polioxietileno alquilfenol éter), mais um tratamento controle (sem aplicação), foram comparados avaliando-se o tamanho de gotas, depósito, tensão superficial, ângulo de contato, absorção, ácido chiquímico e controle. Também foram feitos estudos para comparar a anatomia foliar de *D. insularis* e os efeitos dos tratamentos sobre a superfície foliar e os tecidos internos por técnicas de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz. Na última etapa do trabalho, duas populações de *D. insularis* (resistente e suscetível), foram comparadas quanto à absorção, produção de compostos da rota do ácido chiquímico, metabolismo e controle. A quantificação dos compostos foi realizada por cromatografia líquida e espectrometria de massas, 24h após a aplicação dos tratamentos e o controle avaliado aos 21 dias após a aplicação. Os resultados revelaram que todas as populações de *D. insularis* coletadas em lavouras com soja transgênica apresentaram baixa sensibilidade ao glyphosate quando submetidas à dose comercial do herbicida (1080 g e.a. ha<sup>-1</sup>), e alta sensibilidade ao clethodim. O fator de resistência máximo entre as populações foi de 15, sendo a resposta ao herbicida dependente do estágio de desenvolvimento da planta. As formulações não

apresentaram diferenças significativas em relação à absorção, entretanto, os adjuvantes proporcionaram incrementos de até 170% da quantidade de herbicida absorvido quando comparado aos tratamentos sem adjuvantes. O incremento da absorção não foi suficiente para o controle eficaz da população resistente, porém, a utilização de adjuvante apropriado pode ser útil para a otimização do uso de glyphosate no controle da *D. insularis*. Os resultados revelaram que o mecanismo de resistência de *D. insularis* não está envolvido à absorção do glyphosate e metabolização do herbicida pela planta.

**Palavras-chave:** capim-amargoso, tecnologia de aplicação, absorção de herbicida, tamanho de gotas, tensão superficial, depósito da pulverização, anatomia foliar.

## ABSTRACT

The knowledge about weed resistance to herbicides, especially of sourgrass weed (*Digitaria insularis* L.) and application technology are fundamental aspects for weed management recommendations and performance improvement for herbicide use. Thus, the present research had as objectives to study: (i) the sensitivity of sourgrass populations (*D. insularis* L.) to glyphosate and chethodim herbicides; (ii) to study the processes by which the application technology and in particular glyphosate formulations and adjuvants may to contribute for control optimization of *D. insularis*; (iii) the influence of these factors on the absorption and metabolism of susceptible and resistant *D. insularis* to herbicide. In order, 62 sourgrass populations were collected in Paraná and São Paulo states, most them coming from of transgenic soybeans crops, tolerant to glyphosate. Screening tests were conducted to determine the sourgrass populations sensitivity to herbicides by means of frequency response curves studies. With this data, resistant and susceptible sourgrass populations to glyphosate were selected for resistance level determination through dose-response curve studies at different growth stages of plant. Subsequently, assays were performed to compare glyphosate formulations and adjuvants on application technology variables. In these assays, two glyphosate formulations (WG and SL) and five combinations (without adjuvant, mineral oil, methylated vegetable oil, ethoxylated alkyl ester, polyoxyethylene alkylphenol ether) plus a control treatment (no application) were compared by evaluating the droplets spectrum, deposition, surface tension, contact angle, absorption, shikimic acid and control. Studies have also been performed to compare the foliar anatomy of *D. insularis* and the effects of treatments on leaf surface and internal tissues by scanning electron microscopy and light microscopy. In the last step of study, two populations of *D. insularis* (resistant and susceptible) were compared for absorption, production of shikimic acid route compounds, metabolism and control. The quantification of the compounds was performed by liquid chromatography and mass spectrometry, 24 hours after the application of the treatments and the control evaluated at 21 days after the application. The results showed that all populations of *D. insularis* collected on crops with transgenic soybeans showed low sensitivity to glyphosate when submitted to herbicide commercial dose (1080 g e.a. ha<sup>-1</sup>), and high sensitivity to clethodim. The maximum resistance factor among the populations was 15, and the response to the

herbicide depended of growth stage of plant. The formulations showed no significant differences in absorption, however, the adjuvants provided increases of up to 170% of the amount of herbicide absorbed when compared to treatments without adjuvants. The increase uptake was not sufficient for the effective control of resistant population, however, the use of appropriate adjuvant may be useful for the optimization of use of glyphosate in the control of *D. insularis*. The results revealed that the resistance mechanism of *D. insularis* is not involved in the absorption of glyphosate and metabolization of the herbicide by plant.

**Key words:** sourgrass weed, applicatinon technology, herbicides uptake, droplet spectrum, surfacing tension, spray deposit, leaf anatomy.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DE UMA LAVOURA DE SOJA RR, ONDE SE PROCEDEU A COLETA DE SEMENTES COM SUSPEITA DE RESISTÊNCIA, GOIOERÊ-PR, 2015. ....28
- FIGURA 2 - PONTOS DE COLETA DAS POPULAÇÕES: REGIÕES OESTE, MEIO-OESTE E NORTE DO ESTADO DO PARANÁ; CENTRO-OESTE E SUDOESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO. ....31
- FIGURA 3 - CURVAS DA FREQUÊNCIA ACUMULADA E NÃO ACUMULADA DOS SINTOMAS VISUAIS DE CONTROLE (%) E MATÉRIA SECA RESIDUAL (%), EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA, DE POPULAÇÕES DE *D. INSULARIS* COLETADAS EM ÁREAS COM SUSPEITA DE RESISTÊNCIA AO GLYPHOSATE, NO PRIMEIRO ENSAIO SCREENING AO HERBICIDA. ....37
- FIGURA 4 - CURVAS DA FREQUÊNCIA ACUMULADA E NÃO ACUMULADA DOS SINTOMAS VISUAIS (%) E DA MATÉRIA SECA (%), EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA, OBTIDOS EM POPULAÇÕES DE *D. INSULARIS* COLETAS EM ÁREAS COM SUSPEITA DE RESISTÊNCIA, NO SEGUNDO ENSAIO SCREENING AO GLYPHOSATE, NAS DOSES DE 1080 E 2160 G. E. A. HA<sup>-1</sup>. ....40
- FIGURA 5 - CURVAS DA FREQUÊNCIA ACUMULADA E NÃO ACUMULADA DOS SINTOMAS VISUAIS (À ESQUERDA) E DA PORCENTAGEM DE REDUÇÃO DA MATÉRIA SECA (À DIREITA), EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA, DAS POPULAÇÕES DE *D. INSULARIS* AOS 30 DIAS APÓS A APLICAÇÃO (DAA) DO HERBICIDA CLETHODIM. ....42
- FIGURA 6 - CURVAS DOSE-RESPOSTA PARA AS VARIÁVEIS CONTROLE (%) E MATÉRIA SECA (%) DE POPULAÇÕES DE *D. INSULARIS* RESISTENTES E SUSCETÍVEIS AO GLYPHOSATE, NO ESTÁDIO DE 2 A 4 FOLHAS VERDADEIRAS, OBTIDAS AOS 21 DAA DO HERBICIDA. ....44
- FIGURA 7 - CURVAS DE DOSE-RESPOSTA PARA AS VARIÁVEIS CONTROLE (%) E MATÉRIA SECA (%), EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA, DE POPULAÇÕES DE *D. INSULARIS* RESISTENTES E SUSCETÍVEIS AO GLYPHOSATE, NO ESTÁDIO DE 2 A 4 PERFILHOS, OBTIDAS AOS 21 DAA DO HERBICIDA. ....46
- FIGURA 8 - VALORES (MÉDIAS ± EP) DAS VARIÁVEIS: (A) PORCENTAGEM DE GOTAS MENORES DO QUE 100 µM (G<100 µM), (B) DIÂMETRO MEDIANO VOLUMÉTRICO - DMV (µM); (C) COEFICIENTE DE UNIFORMIDADE (COEF.) E (D) DEPÓSITO DA PULVERIZAÇÃO (U.L.G<sup>-1</sup>) EM PLANTAS DE *D. INSULARIS* PARA SOLUÇÕES CONTENDO DIFERENTES FORMULAÇÕES E ADJUVANTES. ....63
- FIGURA 9 - VALORES (MÉDIAS ± EP) DA TENSÃO SUPERFICIAL (MN.M<sup>-1</sup>) AOS 5 (A) E 30 SEGUNDOS (B) APÓS A FORMAÇÃO DA GOTA PENDENTE PARA SOLUÇÕES CONTENDO DIFERENTES FORMULAÇÕES E ADJUVANTES. ....65
- FIGURA 10 - COMPONENTES PRINCIPAIS, COM RESPECTIVAS COMBINAÇÕES ENTRE: (A) CP1 E CP2; (B) CP1 E CP3, TOMANDO-SE COMO BASE O CONJUNTO VARIÁVEIS

	PERTENCENTES DE CARACTERIZAÇÃO DA TECNOLOGIA DE APLICAÇÃO.....	68
FIGURA 11 - VALORES (MÉDIAS ± EP) DO ÂNGULO DE CONTATO ENTRE A GOTA E AS SUPERFÍCIES (PARAFILME E <i>D. INSULARIS</i> ) DE SOLUÇÕES CONTENDO DIFERENTES FORMULAÇÕES E ADJUVANTES.....		71
FIGURA 12 - IMAGENS EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV) DA MICROESTRUTURA DAS SUPERFÍCIES ADAXIAL E ABAXIAL DE <i>D. INSULARIS</i> . .....		72
FIGURA 13 - SINTOMAS DE FITOTOXICIDADE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) NA SUPERFÍCIE ADAXIAL DE FOLHAS DE <i>D. INSULARIS</i> 4 DIAS APÓS A APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS. TRATAMENTOS: T1 – TESTEMUNHA (ÁGUA); T2 - FORMULAÇÃO SL (SL); T3 – SL +AUREO®; T4 – SL +NIMBUS®; T5 – SL + LANZAR®; T6 – SL +IHARAGUEN-S®; T7 – FORMULAÇÃO WG (WG); T8 - WG+AUREO®; T9 - WG+LANZAR®; T 10 - WG+NIMBUS®; T11 - WG+IHARAGUEN-S®.....		73
FIGURA 14 - IMAGEM EM MICROSCOPIA DE LUZ (ML) DE CORTES TRANSVERSAIS DE FOLHAS DE <i>D. INSULARIS</i> , ILUSTRANDO O ASPECTO DOS TECIDOS FOLIARES, JUNTAMENTE COM AS MEDIDAS REALIZADAS DA ESPESSURA TOTAL (ET), MESOFILO (ME), EPIDERME ADAXIAL (AD) E ABAXIAL (AB), SEM A APLICAÇÃO DO GLYPHOSATE (A) E COM O TRATAMENTO HERBICIDA (B) AOS 4 DIAS APÓS A APLICAÇÃO. ....		74
FIGURA 15 - VALORES (MÉDIAS ± EP) DA ESPESSURA DOS TECIDOS FOLIARES DE <i>D. INSULARIS</i> (µM): (A) ESPESSURA TOTAL; (B) EPIDERME ADAXIAL; (C) MESOFILO E (D) EPIDERME ABAXIAL A PARTIR DA APLICAÇÃO DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DE GLYPHOSATE E ADJUVANTES.....		75
FIGURA 16 - VALORES (MÉDIAS ± EP) PARA AS VARIÁVEIS: (A) ABSORÇÃO DO GLYPHOSATE; (B) ÁCIDO CHIQUÍMICO ACUMULADO, 24 HORAS APÓS A APLICAÇÃO DO HERBICIDA; (C) CONTROLE VISUAL E (D) MASSA SECA REMANESCENTE DE <i>D. INSULARIS</i> , AOS 21 DIAS APÓS A APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS.....		78
FIGURA 17 - COMPONENTES PRINCIPAIS, CP1 E CP2, DO CONJUNTO DE VARIÁVEIS PERTENCENTES AOS ENSAIOS DE INTERAÇÃO DO DEPÓSITO-ALVO. TRATAMENTOS: T1 – TESTEMUNHA (ÁGUA); T2 - FORMULAÇÃO SL (SL); T3 – SL + AUREO®; T4 – SL + NIMBUS®; T5 – SL + LANZAR®; T6 – SL + IHARAGUEN-S®; T7 – FORMULAÇÃO WG (WG); T8 – WG + AUREO®; T9 – WG + LANZAR®; T 10 – WG + NIMBUS®; T11 – WG + IHARAGUEN-S®.....		80

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- IDENTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES COM RESPECTIVAS LOCALIDADES, COORDENADAS GEOGRÁFICAS [SUL (S) E OESTE (W)], ALTITUDE (ALT.) E OCUPAÇÃO DA ÁREA (OCUPAÇÃO) NO MOMENTO DA COLETA, 2014/2015. (CONTINUA) .....	29
TABELA 1- IDENTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES COM RESPECTIVAS LOCALIDADES, COORDENADAS GEOGRÁFICAS [SUL (S) E OESTE (W)], ALTITUDE (ALT.) E OCUPAÇÃO DA ÁREA (OCUPAÇÃO) NO MOMENTO DA COLETA, 2014/2015. (TERMINA).....	30
TABELA 2 - SINTOMAS VISUAIS DE CONTROLE (%) E MATÉRIA SECA RESIDUAL (%), EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA, DE POPULAÇÕES DE <i>D. INSULARIS</i> PROVENIENTES DE ÁREAS SEM HISTÓRICO DE APLICAÇÃO DE HERBICIDAS NO PRIMEIRO ENSAIO <i>SCREENING</i> AO GLYPHOSATE. DADOS COLETADOS AOS 21 DAA. ....	36
TABELA 3 - ESTIMATIVAS DOS PARÂMETROS DA EQUAÇÃO, MEDIDAS DE POSIÇÃO E DISPERSÃO DOS MODELOS DE GOMPERTZ AJUSTADOS AOS DADOS DE SINTOMAS VISUAIS DE CONTROLE (%) E MATÉRIA SECA RESIDUAL (%), EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA, DE POPULAÇÕES DE <i>D. INSULARIS</i> COM SUSPEITA DE RESISTÊNCIA AO GLYPHOSATE, NO PRIMEIRO ENSAIO <i>SCREENING</i> COM 50% E 100% DA DOSE DO HERBICIDA, RESPECTIVAMENTE. ....	38
TABELA 4 - SINTOMAS VISUAIS DE CONTROLE (%) E MATÉRIA SECA RESIDUAL (%), EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA, DE POPULAÇÕES DE <i>D. INSULARIS</i> PROVENIENTES DE ÁREAS SEM HISTÓRICO DE APLICAÇÃO DE HERBICIDAS, NO SEGUNDO ENSAIO DE <i>SCREENING</i> AO GLYPHOSATE COM 100% E 200% DA DOSE RECOMENDADA, AOS 21 DAA. ....	39
TABELA 5 - ESTIMATIVAS DOS PARÂMETROS DA EQUAÇÃO, MEDIDAS DE POSIÇÃO E DISPERSÃO DOS MODELOS DE GOMPERTZ AJUSTADOS AOS DADOS DE SINTOMAS VISUAIS DE CONTROLE (%) E MATÉRIA SECA RESIDUAL (%), EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA, DE POPULAÇÕES DE <i>D. INSULARIS</i> COM SUSPEITA DE RESISTÊNCIA AO GLYPHOSATE NO SEGUNDO ENSAIO <i>SCREENING</i> COM 100% E 200% DA DOSE RECOMENDADA DO HERBICIDA.....	41
TABELA 6 - SINTOMAS VISUAIS DE CONTROLE (%) E MATÉRIA SECA RESIDUAL (%), EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA, DE POPULAÇÕES DE <i>D. INSULARIS</i> PROVENIENTES DE ÁREAS SEM HISTÓRICO DE APLICAÇÃO DE HERBICIDAS, NO ENSAIO <i>SCREENING</i> AO CLETHODIM. DADOS COLETADOS AOS 21 DAA.....	42
TABELA 7 - ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS B E C DO MODELO SIGMOIDAL AJUSTADOS AO CLETHODIM E RESPECTIVAS MÉDIA, MEDIANA E MODA DAS POPULAÇÕES DE <i>D. INSULARIS</i> COM SUSPEITA DE RESISTÊNCIA PARA AS VARIÁVEIS CONTROLE (%) E MASSA SECA (%), EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA, OBTIDAS AOS 30 DAA DO	

HERBICIDA, BOTUCATU SP-2017.....	43
TABELA 8 - ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS “A”, “B” E “C”, DO MODELO LOG-LOGÍSTICO AJUSTADO EM RESPOSTA À APLICAÇÃO DE GLYPHOSATE. DOSES (G E. A. HA <sup>-1</sup> ) NECESSÁRIAS AO CONTROLE DE 50% (C <sub>50</sub> OU GR <sub>50</sub> ) E 80% (C <sub>80</sub> OU GR <sub>80</sub> ) DE POPULAÇÕES <i>D. INSULARIS</i> , COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO (R <sup>2</sup> ) E FATOR DE RESISTÊNCIA (FR) NO ESTÁDIO DE 2 A 4 FOLHAS. OS DADOS FORAM OBTIDOS AOS 21 DAA DO HERBICIDA. ....	45
TABELA 9 - ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS “A”, “B” E “C” DO MODELO LOG-LOGÍSTICO AJUSTADO EM RESPOSTA À APLICAÇÃO DE GLYPHOSATE NO ESTÁDIO DE 2 A 4 PERFILHOS. DOSES (G E. A. HA <sup>-1</sup> ) NECESSÁRIAS AO CONTROLE DE 50% (C <sub>50</sub> OU GR <sub>50</sub> ) E 80% (C <sub>80</sub> OU GR <sub>80</sub> ) DE POPULAÇÕES DE <i>D. INSULARIS</i> , COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO DOS MODELOS (R <sup>2</sup> ) E FATOR DE RESISTÊNCIA (FR). OS DADOS FORAM OBTIDOS AOS 21 DAA DO HERBICIDA.....	47
TABELA 10 - RELAÇÃO ENTRE OS VALORES OBTIDOS PARA OS PARÂMETROS DE CONTROLE: C <sub>50</sub> E C <sub>80</sub> E MATÉRIA SECA GR <sub>50</sub> E GR <sub>80</sub> , DO SEGUNDO (2 A 4 PERFILHOS) E PRIMEIRO (2 A 4 FOLHAS) ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DAS POPULAÇÕES DE <i>D. INSULARIS</i> . TODOS OS DADOS SÃO REFERENTES AOS 21 DAA DO GLYPHOSATE. ....	48
TABELA 11 - TRATAMENTOS DOS ENSAIOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DA TECNOLOGIA DE APLICAÇÃO. FORMULAÇÕES DE GLYPHOSATE (I.A. E FORMULAÇÃO) E ADJUVANTES, COM RESPECTIVA DOSE (G E.A. HA <sup>-1</sup> ; V.V <sup>-1</sup> DE PRODUTO COMERCIAL).....	56
TABELA 12 - VALORES DE F DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE GOTAS MENORES DO QUE 100 μM (G<100 μM), DIÂMETRO MEDIANO VOLUMÉTRICO - DMV (μM), COEFICIENTE DE UNIFORMIDADE (COEF), DEPÓSITO DA PULVERIZAÇÃO (μL.G <sup>-1</sup> ) E TENSÃO SUPERFICIAL – TS (MN.M <sup>-1</sup> ) AOS 5 E 30 S APÓS A FORMAÇÃO DA GOTA PENDENTE. ....	61
TABELA 13 - VARIÁVEIS DA CARACTERIZAÇÃO DA TECNOLOGIA DE APLICAÇÃO E RESPECTIVOS AUTOVALORES DOS COMPONENTES PRINCIPAIS, PROPORÇÃO E VARIAÇÃO ACUMULADA. ....	66
TABELA 14 - VALORES DO COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (R) E RESPECTIVA SIGNIFICÂNCIA (P-VALORES) PARA A COMBINAÇÃO DAS VARIÁVEIS DE TAMANHO DE GOTAS, TENSÃO SUPERFICIAL E DEPÓSITO DA PULVERIZAÇÃO, CONSIDERANDO-SE AS MÉDIAS OBTIDAS PARA O CONJUNTO DE TRATAMENTOS.....	69
TABELA 15 - VALORES DE F DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O ÂNGULO DE CONTATO (θ) EM SUPERFÍCIE ARTIFICIAL (PARAFILME) E NATURAL (SUPERFÍCIE ADAXIAL DE <i>D. INSULARIS</i> ) AOS 5 E 30S APÓS A DEPOSIÇÃO DA GOTA NAS SUPERFÍCIES. ....	70
TABELA 16 - VALORES DE F DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A ESPESSURA TOTAL– ET (μM),	

ESPESSURA DA EPIDERME ADAXIAL - ADA ( $\mu\text{M}$ ), MESOFILO - ME ( $\mu\text{M}$ ) E EPIDERME ABAXIAL - ABA ( $\mu\text{M}$ ) DE FOLHAS DA <i>D. INSULARIS</i> AOS 4 DIAS APÓS A APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS (4 DAA).....	75
TABELA 17 - VALORES DE F DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA AS VARIÁVEIS: ABSORÇÃO DO GLYPHOSATE (ABS.) E ÁCIDO CHIQUÍMICO ACUMULADO (ÁC.) 24 HORAS APÓS A APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS, CONTROLE VISUAL (C) E MASSA SECA REMANESCENTE DE <i>D. INSULARIS</i> (C) AOS 21 DIAS APÓS A APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS.....	76
TABELA 18 - AUTOVALORES DAS VARIÁVEIS DA INTERAÇÃO DEPÓSITO-ALVO NOS COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1, CP2 E CP3), COM RESPECTIVO AUTOVALOR, PROPORÇÃO DO COMPONENTE (%) E VARIAÇÃO ACUMULADA (%).....	79
TABELA 19 - VALORES DO COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (R) E RESPECTIVA SIGNIFICÂNCIA (P-VALORES) PARA A COMBINAÇÃO DAS VARIÁVEIS DE TAMANHO DE GOTAS, TENSÃO SUPERFICIAL E DEPÓSITO DA PULVERIZAÇÃO, CONSIDERANDO-SE O CONJUNTO DE TRATAMENTOS.....	81
TABELA 20 - DESCRIÇÃO DOS TRATAMENTOS ENVOLVENDO POPULAÇÕES DE <i>D. INSULARIS</i> (POP.) SUSCETÍVEL (S) E RESISTENTE (R); FORMULAÇÕES DE GLYPHOSATE [I.A (SL E WG)] E ADJUVANTES (MARCA COMERCIAL), COM RESPECTIVA DOSE DE GLYPHOSATE + ADJUVANTE (G E.A. HA-1+ V.V-1). ....	90
TABELA 21 - ABSORÇÃO DE GLYPHOSATE ( $\mu\text{G. G}^{-1}$ ) E ÁCIDO CHIQUÍMICO ACUMULADO ( $\mu\text{G. G}^{-1}$ ) EM POPULAÇÕES DE <i>D. INSULARIS</i> SUSCETÍVEL (S) E RESISTENTE (R), 24 HORAS APÓS A APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS HERBICIDAS.....	93
TABELA 22 - AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS: FENILALANINA, TIROSINA E TRIPTOFANO ( $\mu\text{G. G}^{-1}$ ) EM <i>D. INSULARIS</i> , 24 HORAS APÓS A APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS .....	96
TABELA 23 - NOTAS DOS SINTOMAS VISUAIS DE CONTROLE (%) E MASSA SECA RESIDUAL (%) DE <i>D. INSULARIS</i> AOS 21 DIAS APÓS A APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS. ....	97



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	21
2 CAPÍTULO 1: SENSIBILIDADE DE <i>Digitaria insularis</i> (L.) AOS HERBICIDAS GLYPHOSATE E CLETHODIM EM DOIS ESTÁDIOS FENOLÓGICOS DA PLANTA .....	23
2.1 RESUMO.....	23
2.2 ABSTRACT.....	25
2.3 INTRODUÇÃO .....	26
2.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	28
2.4.1 Coletas das sementes e localidades das populações .....	28
2.4.2 Ensaio screening.....	31
2.4.4 Ensaio dose-resposta .....	32
2.4.5 Avaliações dos ensaios .....	33
2.4.6 Análise dos dados.....	33
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
2.5.1 Ensaio screening 1 – glyphosate .....	36
2.5.2 Ensaio screening 2 – glyphosate .....	39
2.5.4 Ensaio dose-resposta ao glyphosate – Estádio de 2 a 4 folhas.....	43
2.5.5 Ensaio dose-resposta ao glyphosate – Estádio de 2 a 4 perfilhos (20 a 40 cm).....	46
2.5.6 Relação entre os estádios de desenvolvimento da <i>D. insularis</i> .....	47
2.6 CONCLUSÃO .....	48
REFERÊNCIAS.....	49
3 CAPÍTULO 2: AS FORMULAÇÕES DE GLYPHOSATE E OS ADJUVANTES INTERFEREM NA TECNOLOGIA DE APLICAÇÃO, NA ABSORÇÃO DO HERBICIDA E NO CONTROLE DE <i>Digitaria insularis</i> (L.)? .....	51
3.1 RESUMO.....	51
3.2 ABSTRACT.....	53
3.3 INTRODUÇÃO .....	54
3.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	56
3.4.1 Caracterização da tecnologia de aplicação .....	57
3.4.2 Interação depósito-alvo .....	58

3.4.3 Controle de <i>D. insularis</i> .....	60
3.4.4 Análise estatística dos dados.....	60
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	61
3.5.1 Tecnologia de Aplicação.....	61
3.5.2 Análise dos componentes principais das variáveis da tecnologia de aplicação .....	66
3.5.3 Interação Depósito-Alvo.....	69
3.6 CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS .....	81
4 CAPÍTULO 3: FORMULAÇÕES DE GLYPHOSATE E ADJUVANTES NA ABSORÇÃO, METABOLISMO E CONTROLE DE <i>Digitaria insularis</i> RESISTENTE E SUSCETÍVEL AO HERBICIDA.....	85
4.1 RESUMO.....	85
4.2 ABSTRACT .....	87
4.3 INTRODUÇÃO .....	88
4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	89
4.4.1 Absorção de glyphosate e determinação simultânea de compostos pertencentes à rota do ácido chiquímico .....	90
4.4.2 Controle de populações de <i>D. insularis</i> .....	91
4.4.3 Análise estatística.....	91
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	92
4.6 CONCLUSÃO.....	97
REFERÊNCIAS .....	98
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	99
REFERÊNCIAS .....	101

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O capim amargoso *Digitaria insularis* (L.) Fedde, é uma espécie daninha perene, pertencente à família Poaceae, cujo primeiro relato de resistência no mundo foi encontrado em 2005, ao herbicida glyphosate, no município de Caaguazu, Província de Alto Paraná, Paraguay (HEAP, 2017). A resistência a esse herbicida no Brasil foi documentada em 2008, na região oeste do estado do Paraná (HEAP, 2017). A partir de então, houve uma ampla disseminação da espécie em todo o país e a confirmação de casos de resistência em outras regiões e culturas agrícolas (ADEGAS 2009, CARVALHO, 2011, LOPEZ-OVEJERO et al., 2017). Em 2016, foi identificada a resistência a herbicidas inibidores da acetil coenzima-A carboxilase (ACCCase), pertencentes à família química ariloxifenoxipropionatos, na região centro-oeste do Brasil (HEAP, 2017).

Os estudos da resistência de plantas daninhas a herbicidas envolvem vários aspectos, como: a identificação de novos casos de espécies resistentes, o conhecimento sobre a disseminação da resistência no campo, os níveis de resistência identificados em diferentes populações e os mecanismos responsáveis pela expressão da resistência. Espera-se que a evolução da resistência de plantas daninhas pode estar relacionada, entre outros fatores, às características intrínsecas à espécie. No caso particular da *D. insularis*, a alta prolificidade, as diferentes formas de propagação, a alta porcentagem de germinação, a facilidade de dispersão pelo vento, a adaptabilidade e a sobrevivência em praticamente todas as épocas do ano, nas condições brasileiras (GEMELLI et al., 2012), podem ter relação com o desenvolvimento da resistência dessa espécie daninha, devido à alta exposição da espécie a herbicidas, normalmente utilizados em seu controle.

Assim, faz-se necessários estudos que tenham por objetivo elucidar os aspectos relacionados à disseminação da resistência de *D. insularis*, nas diferentes regiões agrícolas do país, bem como investigar o nível de resistência entre as populações e os mecanismos pelos quais as plantas daninhas expressão resistência a herbicida, a fim de obter informações precisas para recomendação de práticas que visem a atenuação do problema.

No caso da alta frequência de resistência ser detectada no campo, o restabelecimento da susceptibilidade tornar-se pouco provável, mesmo que adotada medidas como rotação de herbicidas ou práticas de manejo alternativas. Por isso, é

importante a realização de monitoramento com o intuito de evitar a perda de ferramentas de controle importantes como os herbicidas. Além disso, a substituição da aplicação de glyphosate por herbicida alternativo, como os inibidores da ACCase, exerce maior pressão de seleção a favor do desenvolvimento de resistência múltipla, podendo causar maiores impactos sobre os custos de produção para o controle dessa espécie.

A tecnologia de aplicação de herbicidas é considerada um campo de estudos importante na busca pela otimização do controle das plantas daninhas. Dentre as ferramentas que pertencem a tecnologia de aplicação, destacam-se as formulações herbicidas e os adjuvantes utilizados em mistura em tanque. Esses componentes podem modificar as características das gotas formadas, possibilitando a melhor deposição, distribuição sobre as plantas daninhas, além de reduzirem o potencial risco de deriva das pulverizações, proporcionando menores impactos ambientais ocasionados pelos herbicidas.

Outras vantagens na utilização da tecnologia de aplicação de herbicidas apropriada podem ser observadas quando o líquido entra em contato com a superfície-alvo, modificando características como o espalhamento do líquido pulverizado e a ação sobre as superfícies foliares. Estas propriedades podem refletir na maior penetração e absorção do herbicida, promovendo a otimização do seu uso.

No caso particular das plantas daninhas resistentes, essas modificações poderiam apresentar impactos para o aumento do seu controle. Trabalhos que objetivam estudar a relação entre a tecnologia de aplicação e o controle de plantas daninhas resistentes são pouco frequentes em literatura. Logo, o presente trabalho teve como objetivos: (i) estudar a frequência das respostas de populações de capim-amargoso (*D. insularis* L.) aos herbicidas glyphosate e chethodim, bem como o nível de resistência ao glyphosate; (ii) estudar os processos pelos quais a tecnologia de aplicação e em particular as formulações de glyphosate e os adjuvantes podem contribuir para a otimização do controle de *D. insularis*, (iii) determinar o efeito das formulações de glyphosate e adjuvantes na absorção do herbicida e controle de *D. insularis* resistente e suscetível, bem como quantificar os compostos: ácido chiquímico, triptofano, fenilalanina, tirosina e ácido aminometilfosfônico (AMPA), envolvidos na rota metabólica de atuação do glyphosate e metabolismo do herbicida pela planta.

## 2 CAPÍTULO 1

### **SENSIBILIDADE DE *Digitaria insularis* (L.) AOS HERBICIDAS GLYPHOSATE E CLETHODIM EM DOIS ESTÁDIOS FENOLÓGICOS DA PLANTA**

#### **2.1 RESUMO**

O aumento da ocorrência de capim-amargoso (*D. insularis*) e as falhas de controle desta planta daninha, observadas a partir da aplicação de herbicidas, em diferentes regiões agrícolas do Brasil, têm gerado preocupação entre os agricultores, sendo necessário o monitoramento e a caracterização do nível da resistência dessa espécie. O objetivo do trabalho foi avaliar a sensibilidade de populações de capim-amargoso aos herbicidas glyphosate e clethodim, bem como determinar os níveis de resistência das populações ao glyphosate, em estádios de desenvolvimento da planta. Para isso, 62 populações de capim-amargoso foram coletadas nos estados do Paraná e São Paulo, sendo submetidas à aplicação de 540; 1080 e 2160 g e.a. ha<sup>-1</sup> de glyphosate e 108 g i.a. ha<sup>-1</sup> de clethodim, respectivamente, em ensaios *screening*. Mediante o resultado desta etapa, foram selecionadas cinco populações de capim-amargoso, sendo três resistentes e duas suscetíveis ao glyphosate para determinação dos fatores de resistência (FR), por meio de estudos de dose-resposta, em dois estádios fenológicos da planta: 2 a 4 folhas e 2 a 4 perfilhos (20 a 40 cm). Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação sob delineamento inteiramente casualizado. Em ambos os ensaios, o controle foi avaliado com base em escala de notas dos sintomas visuais de controle (C) e da percentagem de massa seca (GR) em relação à testemunha (sem aplicação). Nos ensaios *screening* os dados obtidos para as variáveis respostas foram ajustados a curvas da frequência seguindo o modelo de regressão proposto por Gompertz. Os resultados apontaram baixa sensibilidade da *D. insularis* ao glyphosate em 100% das amostras provenientes de áreas de soja transgênica, tolerantes ao glyphosate, e alta sensibilidade ao clethodim. As populações com plantas suscetíveis, com controle superior a 80% na dose recomendada do herbicida, foram encontradas em terrenos baldios, áreas de pastagens e lavouras com cana-de-açúcar. Não foram encontradas populações resistentes ao herbicida clethodim. Com base nos valores de C<sub>50</sub> e GR<sub>50</sub>, o FR máximo obtido entre as populações foi de 15. Estádios de desenvolvimento mais avançados dificultam o controle do capim-amargoso, exigindo doses de 3,5 vezes maiores, em relação ao estágio inicial.

**Palavras-chave:** curva dose resposta, fator de resistência, modelo de Gompertz, controle químico.

## ***Digitaria insularis* (L.) SENSITIVITY TO GLYPHOSATE AND CLETHODIM HERBICIDES IN TWO GROWTH STAGES OF THE PLANT**

### **2.2 ABSTRACT**

The increase in the occurrence of sourgrass weed (*D. insularis*) and control failures observed from the application of herbicides, observed in different agricultural regions of Brazil, have generated concern among the farmers, being necessary the monitoring and the characterization of resistance level of this species. The aim of this work was to evaluate the sensitivity sourgrass populations to glyphosate and clethodim herbicides, as well as to determine resistance level of populations to glyphosate at growth stages of weed. For this, 62 populations of sourgrass were collected were collected in the Paraná and São Paulo states, and were submitted to the application of 540; 1080 and 2160 g e. a. ha<sup>-1</sup> of glyphosate and 108 g i. a. ha<sup>-1</sup> of clethodim, respectively, in *screening* assays. Through the result of this step, five populations of sourgrass were selected, three of which were resistant and two susceptible to glyphosate for the determination of resistance factor (FR), through dose-response curve studies, in two growth stages of plant: 2 to 4 leaves and 2 to 4 tillers (20 to 40 cm). The trials were conducted in a greenhouse under a completely randomized design. In both trials, control was evaluated by score scale of visual symptoms of the herbicide (C) and the percentage of dry matter mass (GR) in relation to the control (without application). In the *screening* tests the data obtained for the response variables were adjusted to frequency curves following regression model proposed by Gompertz. The results indicated low sensitivity of *D. insularis* to glyphosate in 100% of the samples from glyphosate tolerant transgenic soybean and high sensitivity the populations to clethodim. The populations with susceptible plants to glyphosate, in which the control obtained was superior to 80% were found in vacant lots, pasture areas and sugar cane fields. No populations resistant to the herbicide clethodim were found. Based on the values of C50 and GR50, the maximum FR obtained between the populations was 15. More advanced growth stages make it difficult to control sourgrass, requiring doses 3.5 times greater than the initial stage.

**Key words:** dose response curve, resistance factor, Gompertz model, chemical control.

## 2.3 INTRODUÇÃO

A *Digitaria insularis* L. Fedde, popularmente conhecida como capim-amargoso, é uma espécie de planta daninha perene, pertencente à família Poaceae, de ocorrência natural em uma ampla variedade de ambientes, incluindo áreas com espécies cultivadas (MONDO et al., 2010). Sua reprodução se dá por sementes ou estruturas vegetativas produzidas em subsuperfície, denominadas rizomas.

A aprovação do plantio de culturas transgênicas, como a soja portadora da tecnologia Roundup Ready® no Brasil, a partir de 1998 (CTNbio, 2017) e a intensificação do uso do glyphosate tem proporcionado mudanças significativas na composição das espécies infestantes, com aumento expressivo das infestações de *D. insularis* em todo o país. No Brasil, no ano de 2014, 93% das lavouras cultivadas com soja eram transgênicas, em área correspondente a 30 milhões de hectares (BROOKES; BARFOOT, 2016). Este fato tem contribuído para o desenvolvimento da resistência dessa espécie aos herbicidas, em especial ao glyphosate.

O primeiro caso de resistência a herbicida de *D. insularis* no mundo foi confirmado em 2005, no município de Caaguazu, Província de Alto Paraná, Paraguai (HEAP, 2017). Em 2008, no Brasil, foi encontrado o primeiro caso confirmado de resistência ao glyphosate na região extremo oeste do estado do Paraná (HEAP, 2017) nas proximidades ao primeiro caso documentado, no Paraguai. Além disso, outros trabalhos relataram a existência de resistência de *D. insularis* ao glyphosate em outras regiões e culturas agrícolas do país (ADEGAS et al., 2010; CARVALHO et al., 2011). Recentemente, a dinâmica populacional de *D. insularis* resistente ao glyphosate foi relatada em pesquisas desenvolvidas junto aos programas de monitoramento de resistência no Brasil (LOPEZ-OVEJERO et al., 2017), retratando a dispersão da resistência dessa espécie em diferentes regiões agrícolas do país.

Com o controle insatisfatório de capim-amargoso ao glyphosate, o herbicida passou a ser substituído por alternativas de ingredientes ativos aplicados em pós-emergência, com destaque principal àqueles do grupo químico inibidores da Acetil Coenzima-A Carboxilase (ACCCase). Além da ação em pós-emergência das plantas daninhas, esses herbicidas apresentam características importantes como ação seletiva a dicotiledôneas, como é o caso da soja, e elevada eficácia no controle de gramíneas. Devido a tais características, houve ampliação da utilização dos herbicidas inibidores da ACCCase, o que pode ter contribuído para a constatação do primeiro caso de resistência de *D. insularis* a herbicidas com esse mecanismo de

ação no Brasil (HEAP, 2017). Portanto, acentuam-se as preocupações ao surgimento de plantas que expressem resistência múltipla aos inibidores da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) e inibidores da ACCase.

Considerando o desenvolvimento e a reprodução de *D. insularis*, várias características contribuem para a exposição e a evolução da resistência a herbicidas, tais como: alta prolificidade, adaptabilidade e capacidade de se desenvolver o ano todo na maioria das regiões brasileiras (GEMELLI et al., 2012), facilidade de dispersão pelo vento, baixo percentual de dormência e a alta taxa de germinação (MENDONÇA et al., 2014; MONDO et al., 2010). Além disso, estudos recentes têm mostrado que o fluxo de máquinas agrícolas e a seleção de populações resistentes, de origem independente, são fatores importantes que contribuem com a dispersão de sementes por longas distâncias (LOPEZ-OVEJERO, 2017).

Nesse contexto, não apenas as identificações de casos inéditos de resistência são importantes, mas também o conhecimento do quadro atual de evolução da resistência no campo. Assim, tornam-se importantes os trabalhos voltados ao estudo da sensibilidade de populações de plantas daninhas a herbicidas, a fim de alertar os produtores e demais interessados quanto à dispersão da espécie nas diferentes regiões agrícolas, bem como a adoção de práticas de manejo visando atenuar os impactos negativos provocados pelo aumento da ocorrência de resistência e evitar a perda de ferramentas de manejo das plantas daninhas, tais como os herbicidas.

Em estudos de monitoramento de resistência, a amplitude da resposta de populações de plantas daninhas a herbicidas e a variação ao longo do tempo podem ser investigadas de diferentes formas, sendo uma delas através da frequência da ocorrência da resistência. Neste caso particular, a utilização de métodos estatísticos que possam facilitar a interpretação dos resultados obtidos a campo pode contribuir para o melhor entendimento dos resultados e inferência sobre a evolução da resistência a herbicidas.

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a sensibilidade de populações de capim-amargoso (*Digitaria insularis* L.) aos herbicidas glyphosate e clethodim, bem como determinar os níveis de resistência de populações de capim-amargoso ao glyphosate, em dois estádios de desenvolvimento da planta.

## 2.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.4.1 Coletas das sementes e localidades das populações

Para a instalação dos ensaios, 62 populações de *D. insularis* foram coletadas em regiões agrícolas do oeste, meio-oeste e norte do estado do Paraná e sudoeste e centro-sul do estado de São Paulo, entre outubro de 2014 a fevereiro de 2015, quando havia grande frequência de ocorrência de *D. insularis* nas propriedades agrícolas destas regiões.

A maior parte das populações de *D. insularis* foi proveniente de lavouras de soja Roundup Ready® (RR) que haviam recebido aplicação dos herbicidas glyphosate e clethodim, porém, não apresentaram controle satisfatório, caracterizando, dessa forma, áreas com suspeita de resistência (Figura 1).

**FIGURA 1**-REPRESENTAÇÃO DE UMA LAVOURA DE SOJA RR, ONDE SE PROCEDEU A COLETA DE SEMENTES COM SUSPEITA DE RESISTÊNCIA, GOIOERÊ-PR, 2015.



Também foram realizadas coletas em áreas sem histórico de aplicação dos herbicidas, localizadas em terrenos baldios, áreas de pastagem e de cana-de-açúcar, a fim de obter populações suscetíveis necessárias nas avaliações comparativas de resistência dessa planta daninha a herbicidas.

Cada população de capim-amargoso foi representada por uma amostra composta por sementes coletadas de 20 a 40 plantas, conforme metodologia

proposta por Burgos et al. (2013). As sementes foram retiradas das panículas de plantas em estágio de maturação, as quais foram armazenadas em sacos de papel devidamente identificados. No momento da coleta foram registradas as coordenadas geográficas dos pontos de amostragens, a altitude, o estado, o município e as condições da ocupação da área (Tabela 1). A distribuição geográfica dos locais onde as populações foram coletadas está apresentada na Figura 2.

**TABELA 1-** IDENTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES COM RESPECTIVAS LOCALIDADES, COORDENADAS GEOGRÁFICAS [SUL (S) E OESTE (W)], ALTITUDE (ALT.) E OCUPAÇÃO DA ÁREA (OCUPAÇÃO) NO MOMENTO DA COLETA, 2014/2015. (CONTINUA)

Pop.	Município/UF.	S	W	Alt.	Ocupação
1	Goioerê/PR	24 <sup>0</sup> 06'35.2"	053 <sup>0</sup> 01'15.7"	454	Café
2	Goioerê/PR	24 <sup>0</sup> 11'38.3"	053 <sup>0</sup> 1'13.1"	484	Terreno baldio
3	Goioerê/PR	24 <sup>0</sup> 11'19.09"	053 <sup>0</sup> 1'57.6822"	469	Terreno baldio
4	Goioerê/PR	24 <sup>0</sup> 08'44.3"	053 <sup>0</sup> 00'52.7"	407	Soja RR
5	Goioêre/PR	24 <sup>0</sup> 12'46.8"	053 <sup>0</sup> 01'27.6"	490	Soja RR
6	Goioêre/PR	24 <sup>0</sup> 13'53.4"	053 <sup>0</sup> 01'49.8"	439	Soja RR
7	Goioêre/PR	24 <sup>0</sup> 14'17.1"	053 <sup>0</sup> 02'00.1"	448	Soja RR
8	Goioerê/PR	24 <sup>0</sup> 12'31.0"	052 <sup>0</sup> 59'51.6"	514	Soja RR
9	Goioerê/PR	24 <sup>0</sup> 13'09.2"	052 <sup>0</sup> 59'53.1"	480	Soja RR
10	Quarto Centenário/PR	24 <sup>0</sup> 16'3.2"	053 <sup>0</sup> 01'58.9"	515	Soja RR
11	Quarto Centenário/PR	24 <sup>0</sup> 15'18.6"	053 <sup>0</sup> 04'4.5"	469	Soja RR
12	Goioerê/PR	24 <sup>0</sup> 07'11.7"	053 <sup>0</sup> 01'21.5"	466	Soja RR
13	Goioerê/PR	24 <sup>0</sup> 09'07.7"	053 <sup>0</sup> 01'07.9"	411	Soja RR
14	Mariluz/PR	24 <sup>0</sup> 03'19.5"	053 <sup>0</sup> 07'10.3"	426	Soja RR
15	Mariluz/PR	24 <sup>0</sup> 03'14.2"	053 <sup>0</sup> 08'18.8"	439	Soja RR
16	Janiópolis/PR	24 <sup>0</sup> 09'07.1"	052 <sup>0</sup> 47'12.9"	544	Soja RR
17	Boa Esperança/PR	24 <sup>0</sup> 13'32"	052 <sup>0</sup> 46'33.1"	567	Soja RR
18	Boa Esperança/PR	24 <sup>0</sup> 15'21.0"	052 <sup>0</sup> 50'51.7"	504	Soja RR
19	Quarto Centenário/PR	24 <sup>0</sup> 14'31.6"	053 <sup>0</sup> 05'34.5"	435	Soja RR
20	Quarto Centenário/PR	24 <sup>0</sup> 14'17.3"	053 <sup>0</sup> 06'46.9"	378	Soja RR
21	Quarto Centenário/PR	24 <sup>0</sup> 13'16.9"	053 <sup>0</sup> 08'39.9"	420	Soja RR
22	Bandeirantes/PR	24 <sup>0</sup> 14'26.8"	053 <sup>0</sup> 09'47.0"	347	Soja RR
23	Bandeirantes/PR	24 <sup>0</sup> 18'09.9"	053 <sup>0</sup> 13'29.5"	426	Soja RR
24	Bandeirantes/PR	24 <sup>0</sup> 19'44.7"	053 <sup>0</sup> 15'53.9"	357	Soja RR
25	Bandeirantes/PR	24 <sup>0</sup> 19'19.4"	053 <sup>0</sup> 15'02.9"	381	Soja RR
26	Formosa do Oeste/PR	24 <sup>0</sup> 18'15.1"	053 <sup>0</sup> 17'02.9"	305	Soja RR
27	Bandeirantes/PR	24 <sup>0</sup> 18'49.0"	053 <sup>0</sup> 11'52.5"	419	Soja RR
28	Quarto Centenário/PR	24 <sup>0</sup> 16'06.8"	053 <sup>0</sup> 03'54.6"	467	Convencional
29	Moreira Sales/PR	24 <sup>0</sup> 03'20.6"	053 <sup>0</sup> 03'10.1"	447	Soja RR

**TABELA 2-** IDENTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES COM RESPECTIVAS LOCALIDADES, COORDENADAS GEOGRÁFICAS [SUL (S) E OESTE (W)], ALTITUDE (ALT.) E OCUPAÇÃO DA ÁREA (OCUPAÇÃO) NO MOMENTO DA COLETA, 2014/2015.  
(TERMINA)

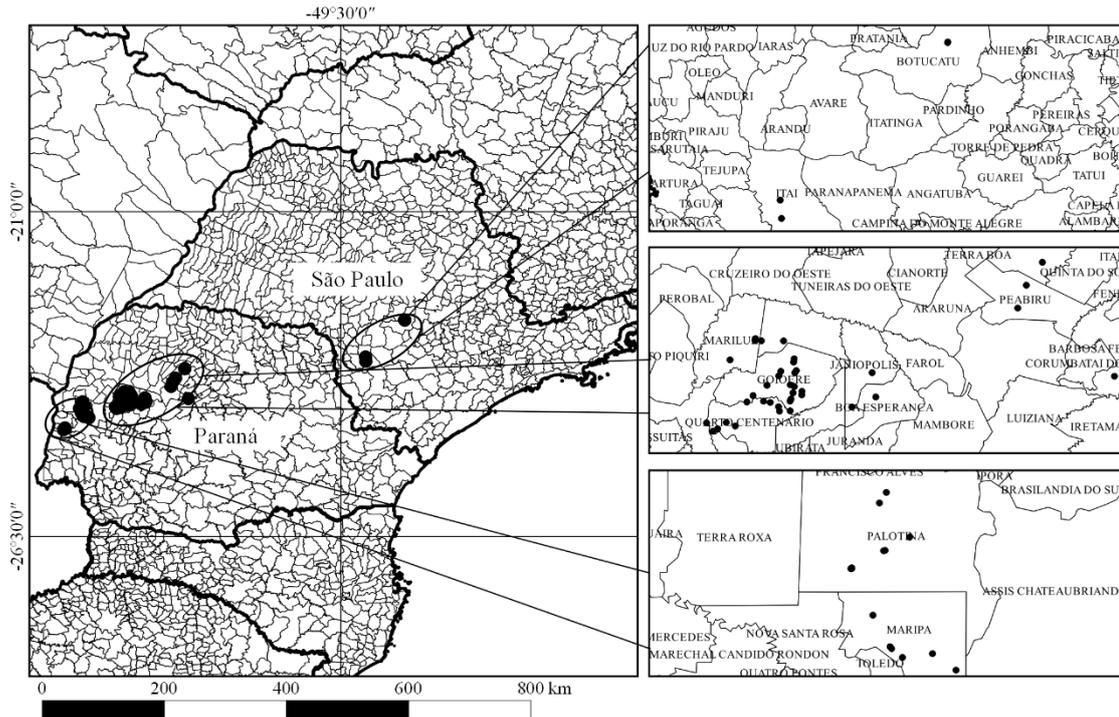
30	Mariluz/PR	24 <sup>0</sup> 02'55.0"	053 <sup>0</sup> 08'13.6"	433	Soja RR
31	Mariluz/PR	24 <sup>0</sup> 06'47.6"	053 <sup>0</sup> 12'49.2"	342	Soja RR
32	Goioerê/PR	24 <sup>0</sup> 08'52.6"	053 <sup>0</sup> 03'40.0"	420	Soja RR
33	Goioerê/PR	24 <sup>0</sup> 11'24.7"	053 <sup>0</sup> 06'09.8"	442	Soja RR
34	Campo Mourão/PR	23 <sup>0</sup> 57'22.9"	052 <sup>0</sup> 20'57.9"	532	Soja RR
35	Campo Mourão/PR	23 <sup>0</sup> 53'13.7"	052 <sup>0</sup> 19'25.2"	492	Soja RR
36	Peabiru/PR	23 <sup>0</sup> 49'03.3"	052 <sup>0</sup> 16'31.3"	446	Soja RR
37	Ivailândia/PR	23 <sup>0</sup> 39'24.9"	052 <sup>0</sup> 07'07.2"	340	Soja RR
38	Goioerê/PR	24 <sup>0</sup> 17'06,7"	053 <sup>0</sup> 05'22,6"	415	Soja RR
39	Goioerê/PR	24 <sup>0</sup> 16'16,46"	053 <sup>0</sup> 06'81,08"	452	Soja RR
40	M.C. Rondon	24 <sup>0</sup> 41'29,6"	054 <sup>0</sup> 09'19,4"	267	Soja RR
41	M.C. Rondon	24 <sup>0</sup> 39'47,3"	054 <sup>0</sup> 07'48,8"	274	Soja RR
42	M.C. Rondon	24 <sup>0</sup> 39'43,4"	054 <sup>0</sup> 07'48,9"	272	Soja RR
43	Palotina/PR	24 <sup>0</sup> 20'02,0"	053 <sup>0</sup> 53'15,5"	328	Soja RR
44	Palotina/PR	24 <sup>0</sup> 19'57,7"	053 <sup>0</sup> 53'10,8"	340	Soja RR
45	Palotina/PR	24 <sup>0</sup> 20'02,0"	053 <sup>0</sup> 73'50,3"	359	Soja RR
46	Palotina/PR	24 <sup>0</sup> 17'10,5"	053 <sup>0</sup> 47'58,3"	340	Soja RR
47	Maripá/PR	24 <sup>0</sup> 29'15,8"	053 <sup>0</sup> 43'46,8"	398	Soja RR
48	Maripá/PR	24 <sup>0</sup> 27'45,7"	053 <sup>0</sup> 45'54"	431	Soja RR
49	Palotina/PR	24 <sup>0</sup> 13'06,6"	053 <sup>0</sup> 50'03,7"	315	Soja RR
50	Palotina/PR	24 <sup>0</sup> 14'04"	053 <sup>0</sup> 50'41"	315	Soja RR
51	Maripá/PR	24 <sup>0</sup> 28'06,6"	053 <sup>0</sup> 48'36,7"	439	Soja RR
52	Maripá/PR	24 <sup>0</sup> 27'18,2"	053 <sup>0</sup> 49'34,9"	437	Soja RR
53	Maripá/PR	24 <sup>0</sup> 27'07,7"	053 <sup>0</sup> 49'43,9"	427	Soja RR
54	Maripá/PR	24 <sup>0</sup> 24'16,2"	053 <sup>0</sup> 51'16,3"	400	Soja RR
55	Palotina/PR	24 <sup>0</sup> 18'24.8"	053 <sup>0</sup> 50'18,18"	342	Terreno baldio
56	Palotina/PR	24 <sup>0</sup> 18'22.9"	053 <sup>0</sup> 50'10,52"	349	Terreno baldio
57	Botucatu/SP	22 <sup>0</sup> 50'02.9"	048 <sup>0</sup> 25'31.6"	798	Pasto
58	Botucatu/SP	22 <sup>0</sup> 49'54.2"	048 <sup>0</sup> 25'29.5"	815	Pasto
59	Botucatu/SP	22 <sup>0</sup> 52'10.8"	048 <sup>0</sup> 45'74. 09"	725	Terreno baldio
60	Avaré/SP	23 <sup>0</sup> 50'81'84"	048 <sup>0</sup> 82'43,53"	625	Terreno baldio
61	Itai/SP	23 <sup>0</sup> 27'34.4"	049 <sup>0</sup> 05'04.5"	639	Pasto vazio
62	Itai/SP	23 <sup>0</sup> 31'55.6"	049 <sup>0</sup> 04'46.1"	644	Cana-de-açúcar

<sup>1</sup>Soja RR= Soja Roundup Ready.

Após a coleta, as sementes foram limpas das impurezas e tratadas com pastilhas de fosfina para controlar insetos e patógenos durante o tempo de

armazenamento e condução dos ensaios. As sementes foram então depositadas em câmara fria, sob temperatura de 10°C e 37% UR, no departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Campus de Botucatu.

**FIGURA 2** - PONTOS DE COLETA DAS POPULAÇÕES: REGIÕES OESTE, MEIO-OESTE E NORTE DO ESTADO DO PARANÁ; CENTRO-OESTE E SUDOESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO.



#### 2.4.2 Ensaios *screening*

Três ensaios *screening* foram conduzidos para determinar a frequência e a amplitude da resposta das populações de capim-amargoso aos herbicidas glyphosate e clethodim. Os dois primeiros ensaios foram conduzidos objetivando avaliar a resposta ao glyphosate, sendo o primeiro realizado com a aplicação das doses de 540 e 1080 g. e. a. ha<sup>-1</sup>, correspondentes a 1/2 e 1 vez a dose comercial do glyphosate (Roundup WG®) para o controle da *D. insularis*. No segundo ensaio *screening* ao glyphosate utilizou-se as doses de 1080 e 2160 g. e. a. ha<sup>-1</sup>, correspondentes a 1 e 2 vezes a dose comercial do herbicida. O terceiro ensaio foi realizado com o objetivo de estudar a resposta ao clethodim aplicado na dose comercial de 108 g. i. a. ha<sup>-1</sup>, adicionando-se 0,5% v/v do surfactante alquil ester etoxilado do ácido fosfórico à calda, conforme recomendação do fabricante. Estes herbicidas foram escolhidos devido à sua utilização recorrente nos campos de soja

RR e devido ao seu potencial para controlar espécies do gênero *Digitaria*.

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, no Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Campus de Botucatu, SP (22°50'41.20"S; 48°26'6.65" O).

Os ensaios foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. As unidades experimentais foram representadas por vasos de polietileno de 0,5 L de capacidade, preenchidos com substrato comercial (Carolina Soil®). Os ensaios foram implantados nos dias 03/04/2015, 27/09/2015 e 29/09/2015. Após a semeadura fez-se o desbaste, deixando-se três plantas distribuídas em cada vaso.

A aplicação de herbicidas nos ensaios foi feita em laboratório quando as plantas atingiram o estágio de 2 a 4 folhas completamente expandidas, utilizando-se um sistema de pulverização móvel com controle de velocidade e pressão. O sistema foi equipado com barra de 3 m de comprimento, contendo pontas de jato plano do tipo AXI 11003 (Jacto®), espaçadas de 0,5 m. O equipamento foi regulado para operar à pressão de 200 kPa, em velocidade de deslocamento de 5 km.h<sup>-1</sup>, provendo volume de calda correspondente a 200 L.ha<sup>-1</sup>.

#### **2.4.4 Ensaios dose-resposta**

Nenhuma das populações de *D. insularis* avaliadas foi considerada resistente ao clethodim. Assim, os estudos de dose-resposta foram realizados apenas com o herbicida glyphosate. A seleção das populações nos ensaios dose-resposta foi feita por meio dos dados obtidos nos ensaios *screening*, tomando como referência os resultados do percentual de controle, aos 21 dias após a aplicação (DAA) e redução de massa seca. Assim, as três populações que apresentaram menor eficiência de controle ao glyphosate e as duas que apresentaram maior sensibilidade ao herbicida foram selecionadas.

Dois ensaios dose-resposta ao glyphosate foram realizados em diferentes fases do desenvolvimento do capim-amargoso. As pulverizações foram realizadas quando as plantas atingiram 2 e 4 folhas e 2 e 4 perfilhos (20 e 40 cm). Nesses ensaios a semeadura foi realizada nos dias 22/10/2015 e 10/11/2015.

Os ensaios foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado, com sete repetições. O local e as condições de aplicação foram as mesmas utilizadas

para os ensaios *screening*.

Para a confecção das curvas de dose-resposta no primeiro estágio foram usadas as seguintes doses: 135, 270, 540, 1.080, 2.160, 4.320, 8.640 e 17.280 g. e. a. ha<sup>-1</sup>, correspondentes a 1/8, 1/4, 1/2, 1, 2, 4, 8 e 16 vezes a dose comercial de glyphosate (Roundup WG®), sendo 1 a dose recomendada para o controle de *D. insularis* (1080 g. e. a. ha<sup>-1</sup>). Esses tratamentos foram comparados ao tratamento testemunha (sem aplicação).

No segundo ensaio, estágio de 2 a 4 perfilhos, a menor dose foi 270 g e. a. ha<sup>-1</sup> e acrescida às doses do ensaio anterior a dose de 34.560 g. e. a. ha<sup>-1</sup> (correspondente a 32 vezes a dose comercial), visando a obtenção do controle total das populações resistentes.

#### **2.4.5 Avaliações dos ensaios**

As avaliações de ambos os ensaios foram feitas com base nos sintomas visuais de controle (ALAM, 1974), atribuindo-se notas que variaram entre 0% (ausência de sintomas) e 100% (morte das plantas), aos 21 DAA. As plantas foram então cortadas rente à superfície do solo e armazenadas em sacos de papel devidamente identificados. Posteriormente, as plantas foram levadas para secagem em estufa de circulação de ar forçada, sob temperatura de 70°C, até que atingissem massa constante. Em seguida, as plantas foram pesadas em balança analítica de precisão e os dados foram utilizados para cálculo da porcentagem de massa seca, em relação à testemunha (sem aplicação).

#### **2.4.6 Análise dos dados**

##### **Ensaio *screening***

As populações coletadas em áreas sem histórico de aplicação foram agrupadas e analisadas separadamente das populações provenientes de campos com histórico de aplicação. Este procedimento foi necessário para a determinação das respostas características aos grupos considerados resistentes e suscetíveis.

Os dados obtidos para as populações com suspeita de resistência foram submetidos à análise de variância e aplicação do teste F. Quando verificada significância, os dados foram ajustados ao modelo de regressão sigmoidal, proposto por Gompertz (1825) para a determinação das frequências acumuladas, conforme a

equação 1:

$$y = e^{[a - e^{(-b - c \cdot x)}]} \quad (1)$$

Nessa equação, a expressão  $e^a$  corresponde à assíntota do modelo. Dessa forma, atribuiu-se o valor 4,605170 ao parâmetro “a”, de modo que  $e^a = 100$ ; “x” representa os valores estimados para as variáveis respostas, “b” o deslocamento da curva ao longo do eixo x e “c” a inclinação da curva em relação à frequência acumulada (VELINI, 1995). Os parâmetros “b” e “c” foram estimados pelo modelo.

A média aritmética das variáveis respostas foi calculada com base nos dados originais e as medidas de posição, moda e mediana obtidas conforme as equações 2 e 3, respectivamente, propostas por Velini (1995):

$$y = -\frac{b}{c} \quad (2)$$

$$y = -\frac{\ln(a - 3,912) + b}{c} \quad (3)$$

A visualização gráfica das medidas de dispersão e da amplitude dos dados foi obtida pela frequência não acumulada dada pela primeira derivada do modelo de Gompertz, de acordo com a equação 4:

$$y' = c * e^{(a - b - c * X - e^{(-b - c * X)})} \quad (4)$$

### Ensaio dose resposta

Os dados obtidos nos ensaios dose-resposta foram submetidos à análise de variância e aplicação do teste F. Quando significativos, os dados foram ajustados aos modelos de regressão não linear do tipo log-logísticos, propostos por Streibig (1988) e Seefeldt et al. (1995) para a análise do controle visual e da redução de massa seca, conforme as equações 5 e 6, respectivamente:

$$y = \frac{a}{\left[1 + \left(\frac{x}{b}\right)^c\right]} \quad (5)$$

$$y = Pmín. + \frac{a}{\left[1 + \left(\frac{x}{b}\right)^c\right]} \quad (6)$$

Em que “y” é a porcentagem de controle ou de massa seca remanescente, “x” a dose do herbicida em g e. a. ha<sup>-1</sup>, “Pmín”, “a”, “b” e “c” são os parâmetros dos modelos, de modo que “Pmín” é o valor mínimo obtido para massa seca residual, “a” é a diferença entre o ponto máximo e mínimo, “b” é a dose que fornece 50% da assíntota e “c” é a declividade da curva em torno de “b”.

Considerando-se que o valor de 100% de controle nem sempre é obtido em ensaios dose-resposta, o valor do parâmetro “b”, estimado pelo modelo, foi desconsiderado e a dose necessária ao controle de 50% (C<sub>50</sub> ou GR<sub>50</sub>) da população foi calculada com base nas equações inversas aos modelos, de acordo com Carvalho et al. (2005). Assim, substitui-se o “y” da equação inversa por 50, para obtenção do C<sub>50</sub> ou GR<sub>50</sub>. Da mesma forma, substituindo-se “y” por 80, obtém-se a dose necessária para atingir o controle satisfatório das populações (≥80% – C<sub>80</sub> ou GR<sub>80</sub>).

A relação entre os valores de C<sub>50</sub> ou GR<sub>50</sub>, obtidos por meio das equações inversas aos modelos log-logísticos das populações com suspeita de resistência e suscetíveis forneceu o fator de resistência (FR), que expressa o número de vezes em que a dose necessária para proporcionar 50% de controle da população resistente é maior que a dose que controla 50% da população suscetível (HALL et al., 1998; CHRISTOFFOLETI, 2002).

As análises dos modelos de regressões não lineares, sigmoidal e log-logísticos foram realizadas com o auxílio do software estatístico SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, SAS Institute, version 9.3., Carry, North Carolina, USA) e os gráficos elaborados por meio do programa computacional Sigmaplot (SYSTAT SOFTWARE, versão 12.5, San Jose, 2013).

## 2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.5.1 Ensaio *screening* 1 – glyphosate

Os resultados das variáveis respostas obtidos do conjunto de populações que foram coletadas em áreas sem histórico de aplicação dos herbicidas glyphosate e clethodim revelam que a aplicação da meia dose e dose comercial do herbicida glyphosate (540 e 1080 g. e. a. ha<sup>-1</sup>) foram suficientes para garantir o controle satisfatório das populações 59 e 60, destacando-as como as populações mais sensíveis ao herbicida, com níveis de controle superior a 82,5% (Tabela 2).

**TABELA 3** -SINTOMAS VISUAIS DE CONTROLE (%) E MATÉRIA SECA RESIDUAL (%), EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA, DE POPULAÇÕES DE *D. INSULARIS* PROVENIENTES DE ÁREAS SEM HISTÓRICO DE APLICAÇÃO DE HERBICIDAS NO PRIMEIRO ENSAIO *SCREENING* AO GLYPHOSATE. DADOS COLETADOS AOS 21 DAA.

Pop.	Município	Ocupação	Dose 540 g. ha <sup>-1</sup>		Dose 1080 g. ha <sup>-1</sup>	
			Cont. (%)	MS (%)	Cont. (%)	MS (%)
2	Goioerê/PR	Terreno <sup>1</sup>	73,50	39,36	91,67	19,91
3	Goioerê/PR	Terreno	73,75	14,18	93,50	12,02
55	Palotina/PR	Terreno	56,25	39,17	33,33	46,20
56	Palotina/PR	Terreno	23,00	57,78	29,33	63,90
57	Botucatu/SP	Pasto	46,67	28,41	53,33	70,72
58	Botucatu/SP	Pasto	76,00	22,60	72,25	17,43
59	Botucatu/SP	Pasto	85,25	22,38	87,50	30,57
60	Avaré/SP	Terreno	82,50	18,66	99,50	13,56
62	Itaí/SP	Cana <sup>2</sup>	53,75	33,15	98,75	16,90
Média			63,41	30,63	73,24	32,36
Mediana			73,5	28,41	87,5	19,91
CV% <sup>3</sup>			31,87	43,86	38,05	69,50

<sup>1</sup>Terreno baldio; <sup>2</sup>Cana-de-açúcar; <sup>3</sup>Coefficiente de variação em porcentagem.

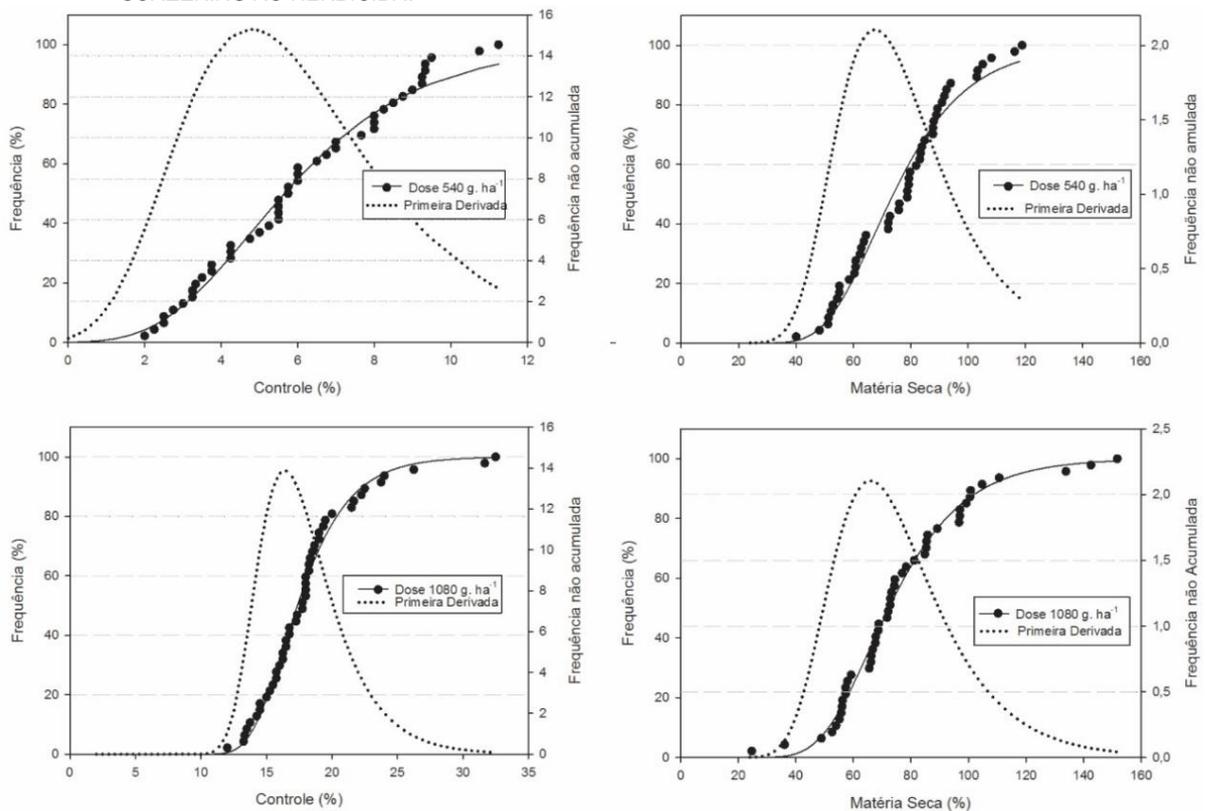
Com a aplicação da dose comercial do herbicida (1080 g e. a. ha<sup>-1</sup>), 67% das populações pertencentes a esse grupo apresentaram controle satisfatório (> 80%), sendo estas consideradas como suscetíveis. Para as demais populações, cujos sintomas visuais de controle foram inferiores a 80%, é provável que a ocorrência de resistência ao glyphosate devido à dispersão de sementes provenientes de áreas vizinhas, tenha contribuído para a manifestação dos menores níveis de controle.

Conforme descrito por Kissmann e Groth (1997), a presença de pelos e apêndices em sementes de capim-amargoso facilita a dispersão das sementes a curtas distâncias pela ação dos ventos, podendo tais características ter contribuído para a dispersão de sementes resistentes em áreas sem histórico de aplicação.

Em relação às populações supostamente resistentes aos herbicidas (Figura 3), as curvas de frequência acumulada revelam que nenhuma das populações pertencentes a esse grupo apresentou controle satisfatório pelo glyphosate, mesmo quando o herbicida foi utilizado na dose comercial de 1080 g. ha<sup>-1</sup>. Esses resultados diferem expressivamente daqueles encontrados para o conjunto de plantas sem histórico de aplicação, o que torna evidente a diferença das respostas entre os dois grupos, com e sem suspeita de resistência.

Os valores altos do coeficiente de determinação ( $r^2$ ), acima de 0,99, para as duas variáveis analisadas, satisfazem as condições de ajustes dos dados ao modelo de Gompertz (Tabela 3). A média calculada para os sintomas visuais de controle foi de 6% e 18% e a matéria seca residual de 67 e 77%, quando submetidas às doses de 540 e 1080 g e. a. ha<sup>-1</sup> de glyphosate, respectivamente (Tabela 3).

**FIGURA 3**-CURVAS DA FREQUÊNCIA ACUMULADA E NÃO ACUMULADA DOS SINTOMAS VISUAIS DE CONTROLE (%) E MATÉRIA SECA RESIDUAL (%), EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA, DE POPULAÇÕES DE *D. INSULARIS* COLETADAS EM ÁREAS COM SUSPEITA DE RESISTÊNCIA AO GLYPHOSATE, NO PRIMEIRO ENSAIO SCREENING AO HERBICIDA.



As diferenças encontradas entre as medidas de posição e dispersão demonstram haver variabilidade entre as respostas de controle nas populações.

Para a variável controle, o intervalo de variação das respostas foi de 2 a 12% e 12 a 34%, enquanto o intervalo de variação para a massa seca residual foi de 40 a 120% e 20 a 160%, quando submetidas às doses de 540 e 1080 g. ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 3).

Esses resultados corroboram com os obtidos por Lopez-Ovejero et al. (2017), que estudaram a frequência e dispersão da resistência de *D. insularis* ao glyphosate em populações provenientes de diferentes regiões agrícolas do Brasil. Nesse estudo, os autores observaram aumento progressivo dos casos de resistência entre os anos de 2012 e 2015. O maior número de casos de resistência foi constatado no oeste do Paraná e sul do Mato Grosso do Sul, em regiões próximas ao primeiro caso de resistência de *D. insularis* registrado no Brasil em 2008.

Os dados de porcentagem de massa seca residual superior à testemunha (>100%), sem aplicação, obtidos para algumas populações, em ambas as doses estudadas sugerem haver estímulo ao crescimento das plantas resistentes pelo efeito da aplicação do glyphosate. Esse fato pode estar relacionado ao maior perfilhamento observado em plantas que receberam aplicação do herbicida.

**TABELA 4-** ESTIMATIVAS DOS PARÂMETROS DA EQUAÇÃO, MEDIDAS DE POSIÇÃO E DISPERSÃO DOS MODELOS DE GOMPERTZ AJUSTADOS AOS DADOS DE SINTOMAS VISUAIS DE CONTROLE (%) E MATÉRIA SECA RESIDUAL (%), EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA, DE POPULAÇÕES DE *D. INSULARIS* COM SUSPEITA DE RESISTÊNCIA AO GLYPHOSATE, NO PRIMEIRO ENSAIO *SCREENING* COM 50% E 100% DA DOSE DO HERBICIDA, RESPECTIVAMENTE.

<b>Dose de 540 g e. a. ha<sup>-1</sup></b>						
<b>Variável</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Moda</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
Controle (%)	-1,9863	0,4161	6,03	5,65	4,77	0,9967
Massa seca (%)	-3,8608	0,0572	67	73,9	67,5	0,994
<b>Dose de 1080 g e. a. ha<sup>-1</sup></b>						
<b>Variável</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Moda</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
Controle (%)	-6,1869	0,3776	18	17,36	16,38	0,995
Massa seca (%)	-3,7717	0,0572	77,08	72,35	65,94	0,998

Assim como discutido por Belz (2014), hormesis é um fenômeno que envolve estímulos proporcionados pelas doses baixas de herbicidas no aumento do crescimento de plantas daninhas, onde a taxa recomendada no campo pode representar uma dose baixa para as plantas daninhas com resistência evoluída a herbicidas e, assim, representar uma dose potencial hormética. Na prática, isso poderia representar em uma condição de campo o favorecimento à competição de plantas resistentes quando comparadas às suscetíveis, o que pode tornar a

aplicação do glyphosate, além de ineficaz ao controle da *D. insularis*, estimulante ao desenvolvimento e perpetuação de populações resistentes no campo.

É oportuno ainda ressaltar que em condições de campo, mesmo os agricultores tendo conhecimento sobre a ineficácia do herbicida glyphosate sobre a *D. insularis*, aplicações continuam sendo realizadas sobre a espécie, muitas vezes com o objetivo de controlar outras espécies daninhas presentes na área. Porém, a adoção dessa prática pode estar favorecendo indiretamente o desenvolvimento dos biótipos resistentes frente aos suscetíveis e, desse modo, contribuindo para acelerar o progresso da resistência no campo.

Apesar de ter sido evidenciado esse resultado, estudos direcionados ao efeito hormesis em plantas daninhas resistentes, como a *D. insularis*, são necessários para a melhor elucidação sobre o assunto.

### 2.5.2 Ensaio *screening* 2 – glyphosate

As populações 55, 56 e 57, provenientes de áreas sem histórico de aplicação de glyphosate e clethodim, foram as únicas que não apresentaram controle satisfatório quando submetidas à aplicação da dose comercial do produto, assemelhando-se aos resultados encontrados no primeiro ensaio (Tabela 4).

**TABELA 5** -SINTOMAS VISUAIS DE CONTROLE (%) E MATÉRIA SECA RESIDUAL (%), EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA, DE POPULAÇÕES DE *D. INSULARIS* PROVENIENTES DE ÁREAS SEM HISTÓRICO DE APLICAÇÃO DE HERBICIDAS, NO SEGUNDO ENSAIO DE *SCREENING* AO GLYPHOSATE COM 100% E 200% DA DOSE RECOMENDADA, AOS 21 DAA.

População	Município	Ocupação	Dose 1080 g. ha <sup>-1</sup>		Dose 2160 g. ha <sup>-1</sup>	
			Cont. (%)	MS (%)	Cont.(%)	MS(%)
2	Goioerê/PR	Terreno <sup>1</sup>	82,50	63,12	100,00	17,59
3	Goioerê/PR	Terreno	100,00	16,21	100,00	12,12
55	Palotina/PR	Terreno	20,00	49,80	100,00	17,66
56	Palotina/PR	Terreno	58,75	140,36	60,00	32,07
57	Botucatu/SP	Pasto	57,00	36,99	95,00	17,89
58	Botucatu/SP	Pasto	100,00	23,76	100,00	12,35
59	Botucatu/SP	Pasto	95,50	20,02	98,50	18,34
60	Avaré/SP	Terreno	100,00	27,79	100,00	17,60
62	Itaí/SP	Cana <sup>2</sup>	100,00	25,31	100,00	11,35
<b>Média</b>			79,31	44,82	94,83	17,44
<b>Mediana</b>			57,00	36,99	95,00	17,89
<b>CV%<sup>3</sup></b>			35,73	86,76	13,88	35,49

<sup>1</sup>Terreno baldio; <sup>2</sup>Cana-de-açúcar; <sup>3</sup>Coefficiente de variação em porcentagem.

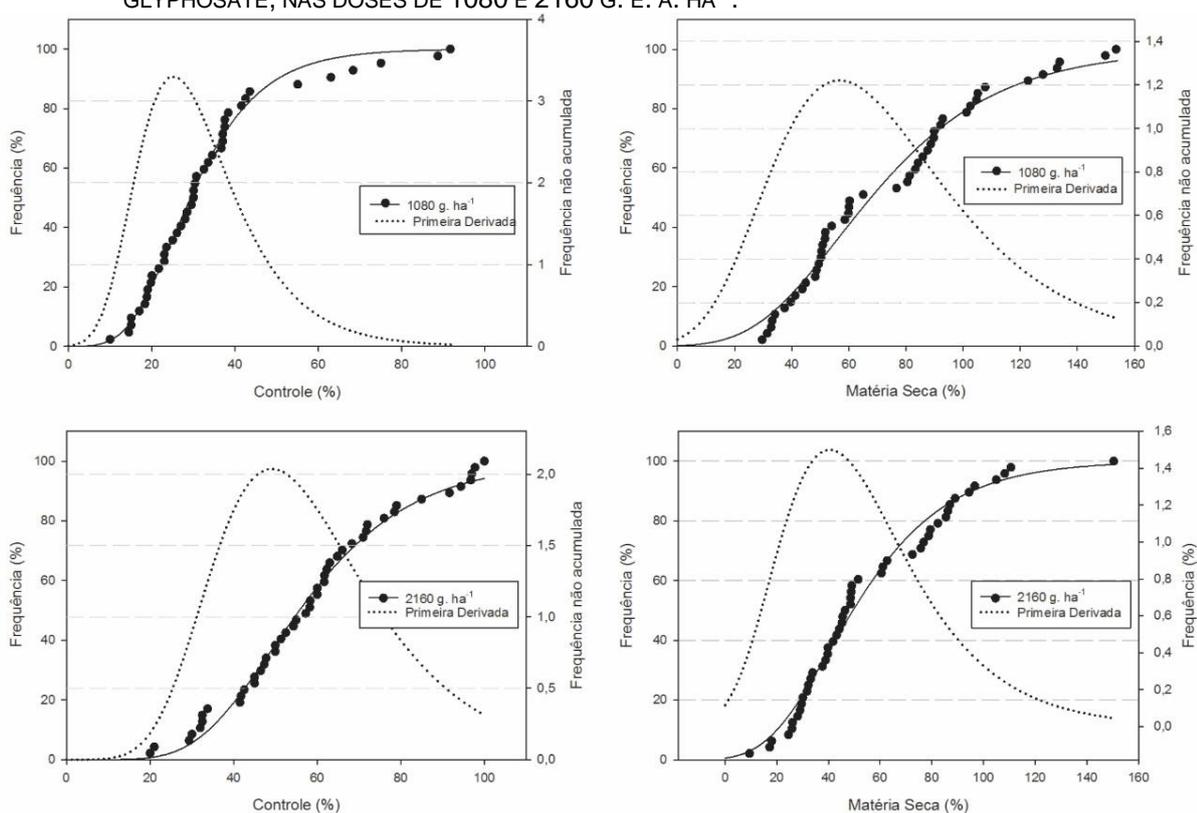
A população 56, proveniente do município de Palotina, PR apresentou controle inferior a 50% quando foi utilizada a dose de 2160 g. ha<sup>-1</sup> de glyphosate, caracterizando, portanto, baixa sensibilidade ao herbicida. A migração das sementes pode ser um dos fatores atribuídos ao resultado observado, haja vista que o município de Palotina é localizado no extremo oeste do estado, região próxima à ocorrência do primeiro caso de resistência ao glyphosate no país (HEAP, 2008).

As curvas de frequência acumulada do conjunto de populações coletadas em áreas com suspeita de resistência a herbicidas (Figura 4) revelaram que apenas duas populações apresentaram eficiência de controle acima de 80% quando submetidas à dose de 1080 g. ha<sup>-1</sup> de glyphosate.

De maneira semelhante, Lopez-Ovejero et al. (2017) constataram em 2014 que 80% das populações estudadas manifestaram algum nível de resistência, indicando a falta de programas adequados de manejo e de resistência nestas áreas.

Com base nas curvas de frequência não acumulada dos sintomas visuais de controle é possível notar a menor concavidade da curva obtida na dose de 1080 g. ha<sup>-1</sup> em relação à apresentada na dose de 2160 g. ha<sup>-1</sup> (Figura 4).

**FIGURA 4 -** CURVAS DA FREQUÊNCIA ACUMULADA E NÃO ACUMULADA DOS SINTOMAS VISUAIS (%) E DA MATÉRIA SECA (%), EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA, OBTIDOS EM POPULAÇÕES DE *D. INSULARIS* COLETAS EM ÁREAS COM SUSPEITA DE RESISTÊNCIA, NO SEGUNDO ENSAIO SCREENING AO GLYPHOSATE, NAS DOSES DE 1080 E 2160 G. E. A. HA<sup>-1</sup>.



Em geral, a aplicação do dobro da dose comercial proporcionou aumento expressivo da sensibilidade das populações ao herbicida e maior variabilidade das respostas ao controle. Mesmo assim, a maior parte das populações não apresentou controle satisfatório, evidenciando a limitação do controle pelo glyphosate nas regiões onde as coletas foram realizadas.

Semelhante ao primeiro ensaio, neste estudo os dados revelaram aumento da porcentagem da matéria seca obtida de algumas das populações avaliadas, mesmo quando submetidas à aplicação do dobro da dose de registro do glyphosate, reforçando a hipótese de que o efeito hormesis pode estar presente em algumas das populações estudadas.

Mais uma vez, os valores do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foram superiores a 0,99, demonstrando haver excelente ajuste dos dados ao modelo de Gompertz (Tabela 5). Os parâmetros referentes às curvas de frequência, mostradas na tabela 5, demonstram a evolução e a presença de índices alarmantes de *D. insularis* resistentes ao glyphosate, mesmo quando as populações foram submetidas ao dobro da dose recomendada do herbicida, tornando evidente as dificuldades ao reestabelecimento da susceptibilidade ao herbicida no campo.

**TABELA 6** - ESTIMATIVAS DOS PARÂMETROS DA EQUAÇÃO, MEDIDAS DE POSIÇÃO E DISPERSÃO DOS MODELOS DE GOMPERTZ AJUSTADOS AOS DADOS DE SINTOMAS VISUAIS DE CONTROLE (%) E MATÉRIA SECA RESIDUAL (%), EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA, DE POPULAÇÕES DE *D. INSULARIS* COM SUSPEITA DE RESISTÊNCIA AO GLYPHOSATE NO SEGUNDO ENSAIO *SCREENING* COM 100% E 200% DA DOSE RECOMENDADA DO HERBICIDA.

Dose de 1080 g e. a. ha <sup>-1</sup>						
Variável	<i>b</i>	<i>c</i>	Média	Media	Moda	$r^2$
Controle (%)	-	0,0899	34,22	29,25	25,17	0,9
Massa seca (%)	-	0,0332	74,51	67,68	56,64	0,9
Dose de 2160 g e. a. ha <sup>-1</sup>						
Variável	<i>b</i>	<i>c</i>	Média	Media	Moda	$r^2$
Controle (%)	-	0,0554	58,60	55,73	49,12	0,9
Massa seca (%)	-	0,0408	56,31	49,49	40,51	0,9

### 2.5.3 Ensaio *screening* ao clethodim

Os resultados das populações coletadas em áreas sem histórico de aplicação de herbicidas, no ensaio *screening* ao clethodim, encontram-se presentes na tabela 6. Por meio dos resultados é possível notar menor variabilidade das respostas conferida pela proximidade entre as medidas de posição e dispersão. A média dos sintomas visuais de controle foi de 95,02% e matéria seca residual de 35,35%,

indicando a susceptibilidade desse grupo de populações ao herbicida.

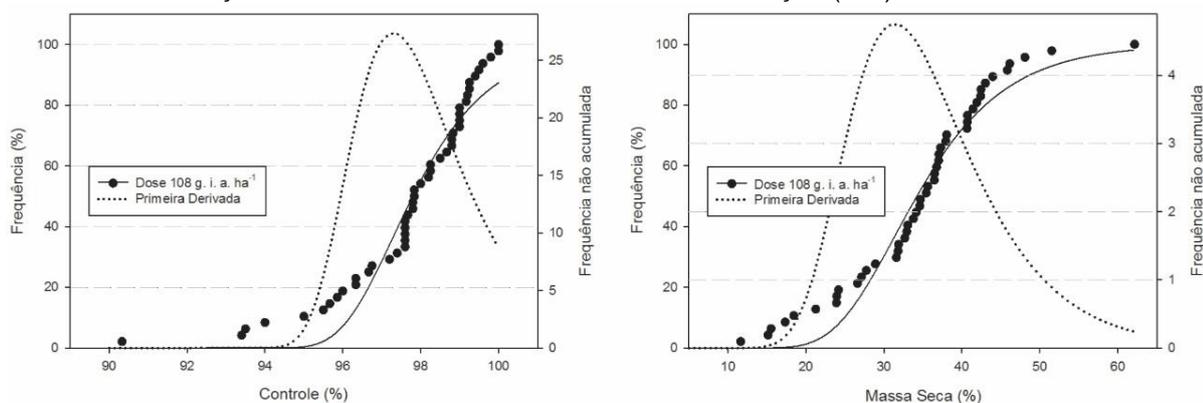
Nenhuma das populações coletadas em áreas com suspeita de resistência aos herbicidas apresentou sintomas de controle menor que 80% (Figura 5). Já em relação aos dados de massa seca remanescente, os intervalos dos dados variaram de 11 a 62%. Isso indica que, mesmo em populações consideradas suscetíveis ao clethodim, a variabilidade dos dados em função das diferenças de tolerância entre as populações ao herbicida é bastante expressiva.

**TABELA 7** - SINTOMAS VISUAIS DE CONTROLE (%) E MATÉRIA SECA RESIDUAL (%), EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA, DE POPULAÇÕES DE *D. INSULARIS* PROVENIENTES DE ÁREAS SEM HISTÓRICO DE APLICAÇÃO DE HERBICIDAS, NO ENSAIO SCREENING AO CLETHODIM. DADOS COLETADOS AOS 21 DAA.

População	Município	Ocupação	Controle (%)	MS (%)
2	Goioerê/PR	Terreno <sup>1</sup>	93,00	53,36
3	Goioerê/PR	Terreno	90,75	42,00
55	Palotina/PR	Terreno	98,20	35,52
56	Palotina/PR	Terreno	93,00	34,16
57	Botucatu/SP	Pasto	95,00	32,53
58	Botucatu/SP	Pasto	97,00	31,56
59	Botucatu/SP	Pasto	93,00	31,33
60	Avaré/SP	Terreno	94,00	30,73
61	Itaí/SP	Pasto vazio	96,40	29,48
62	Itaí/SP	Cana <sup>2</sup>	97,67	27,17
Média			94,80	35,35
Mediana			94,5	32,53
CV% <sup>3</sup>			2,58	21,22

<sup>1</sup>Terreno=Terreno baldio; <sup>2</sup>Cana-de-açúcar; <sup>3</sup>CV% = Coeficiente de variação em porcentagem.

**FIGURA 5** - CURVAS DA FREQUÊNCIA ACUMULADA E NÃO ACUMULADA DOS SINTOMAS VISUAIS (À ESQUERDA) E DA PORCENTAGEM DE REDUÇÃO DA MATÉRIA SECA (À DIREITA), EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA, DAS POPULAÇÕES DE *D. INSULARIS* AOS 30 DIAS APÓS A APLICAÇÃO (DAA) DO HERBICIDA CLETHODIM.



A média dos valores controle visual obtida para esse conjunto de populações

foi de aproximadamente 98% e a matéria seca residual das populações foi de 34%, resultando em controle eficaz de todas as populações estudadas (Tabela 7). Os valores obtidos para o conjunto de populações com suspeita de resistência foram muito próximos aos valores encontrados para o conjunto de populações que não receberam aplicação no campo, o que evidencia que nenhuma população dentre as avaliadas apresenta resistência ao clethodim.

**TABELA 8** - ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS B E C DO MODELO SIGMOIDAL AJUSTADOS AO CLETHODIM E RESPECTIVAS MÉDIA, MEDIANA E MODA DAS POPULAÇÕES DE *D. INSULARIS* COM SUSPEITA DE RESISTÊNCIA PARA AS VARIÁVEIS CONTROLE (%) E MASSA SECA (%), EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA, OBTIDAS AOS 30 DAA DO HERBICIDA, BOTUCATU SP-2017.

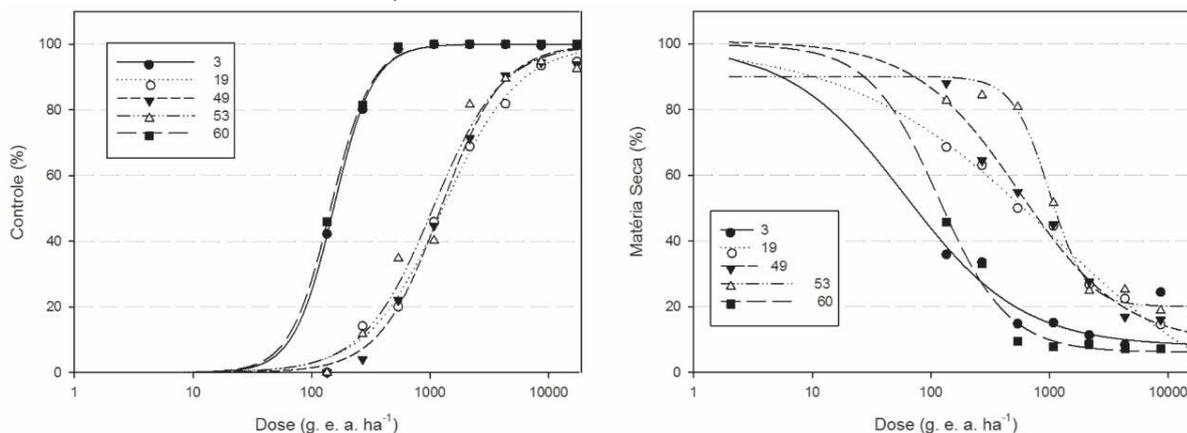
Variável	B	C	Média	Mediana	Moda	r <sup>2</sup>
Controle (%)	-72,3535	0,7436	97,59	97,79	97,30	0,9861
Massa seca (%)	-4,0572	0,1293	34,30	34,21	31,38	0,9908

#### 2.5.4 Ensaio dose-resposta ao glyphosate – Estádio de 2 a 4 folhas

As curvas dose-resposta ao glyphosate no estágio de 2 a 4 folhas de *D. insularis* (Figura 6) indicam haver diferenças de comportamento entre as populações consideradas suscetíveis (3 e 60), coletadas em áreas sem histórico de aplicação, e as populações consideradas resistentes (19, 49 e 53), provenientes de áreas com histórico de aplicação, quando submetidas à aplicação de diferentes doses do herbicida, confirmando assim a resistência das três últimas populações. Fato semelhante foi observado por outras pesquisas que também revelaram haver diferenças significativas entre populações de *D. insularis* (NICOLAI, 2010; MELO, 2011; CARVALHO et al., 2011).

Os valores de coeficiente de determinação ( $r^2$ ), muito próximos a 1, revelam haver ajustes satisfatórios aos modelos de regressão log-logísticos, o que torna precisa a estimativa dos parâmetros das curvas para as variáveis analisadas (Tabela 8).

**FIGURA 6** - CURVAS DOSE-RESPOSTA PARA AS VARIÁVEIS CONTROLE (%) E MATÉRIA SECA (%) DE POPULAÇÕES DE *D. INSULARIS* RESISTENTES E SUSCETÍVEIS AO GLYPHOSATE, NO ESTÁDIO DE 2 A 4 FOLHAS VERDADEIRAS, OBTIDAS AOS 21 DAA DO HERBICIDA.



Os parâmetros apresentados na Tabela 8 revelam o fator de resistência (FR), dado pela relação entre as doses necessárias ao controle (C) e redução de massa seca (GR) de 50% das populações consideradas resistentes em relação às suscetíveis. Os valores de FR para este estágio de desenvolvimento da planta variaram entre 7,29 a 8,84 quando considerada a variável C, e de 8,18 a 15,06 quando considerada a variável GR. Considerando-se os dois níveis de inibição (50 e 80% de controle), o maior valor para a variável GR foi encontrado na população 53, proveniente do município de Maripá, na região oeste do estado do Paraná.

As pesquisas anteriores que relataram a resistência do capim-amargoso ao glyphosate encontraram valores de FR variando entre 3 a 8 (NICOLAI; LÓPEZ-OVEJERO; CHRISTOFOLETTI, 2010; CARVALHO; MELO, 2011). No entanto, a comparação entre os fatores de resistência obtidos em diferentes trabalhos pode ser considerada imprecisa, uma vez que o FR pode variar em função da maior ou menor sensibilidade da população suscetível utilizada em cada estudo. Assim, preferencialmente, os níveis de resistência encontrados nos diferentes trabalhos poderiam ser comparados com base nas doses necessárias para o controle da espécie, considerando-se o nível de inibição, as condições de aplicação e estágio de desenvolvimento.

No presente estudo, as doses necessárias ao controle de 50% para os parâmetros C50 e GR50 foram de 1282,80 e 1104,65 g. ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 8). Essas doses foram muito maiores daquelas encontradas por Melo (2011), que atingiu o mesmo nível de inibição da população de *D. insularis* resistente, no referido estágio de desenvolvimento, com doses equivalentes a

626,13 g. ha<sup>-1</sup> e de 289,47 g. ha<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses resultados sugerem haver maior nível de resistência das populações de *D. insularis* avaliadas neste estudo em comparação àquele trabalho. Conforme relatado por Sammons e Gaines (2014), o acúmulo de diferentes eventos de mutação em uma mesma espécie pode conferir uma resistência cada vez maior, de modo que as doses necessárias para o controle dessas populações resistentes também se tornam cada vez maiores.

Considerando-se o nível de inibição de 80%, as doses necessárias à variável C (Tabela 8) revelam que seriam necessários até aproximadamente 3,3 vezes a dose comercial do glyphosate para a obtenção do controle satisfatório (>80%) da população 19, coletada no município de Quarto Centenário, PR. Já em relação a variável GR, o nível de inibição de 80% seria alcançado caso fosse realizada a aplicação da dose de 379 a 513 g. ha<sup>-1</sup> para as populações suscetíveis e 4147 a 11078 g. ha<sup>-1</sup> para as populações resistentes, o que torna evidente as diferenças de controle existentes entre as populações suscetíveis e resistentes, bem como a ineficácia de controle pelo uso do herbicida glyphosate nas três populações resistentes avaliadas.

**TABELA 9** - ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS “A”, “B” E “C”, DO MODELO LOG-LOGÍSTICO AJUSTADO EM RESPOSTA À APLICAÇÃO DE GLYPHOSATE. DOSES (G E. A. HA<sup>-1</sup>) NECESSÁRIAS AO CONTROLE DE 50% (C<sub>50</sub> OU GR<sub>50</sub>) E 80% (C<sub>80</sub> OU GR<sub>80</sub>) DE POPULAÇÕES *D. INSULARIS*, COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO (R<sup>2</sup>) E FATOR DE RESISTÊNCIA (FR) NO ESTÁDIO DE 2 A 4 FOLHAS. OS DADOS FORAM OBTIDOS AOS 21 DAA DO HERBICIDA.

Controle (%)							
População	a	b	c	C <sub>50</sub>	C <sub>80</sub>	r <sup>2</sup>	FR
3	100,00	153,30	-2,60	153,30	261,49	0,9999	1,06
19	100,00	1282,80	-1,37	1282,80	3522,75	0,9981	8,84
49	100,00	1233,50	-1,68	1233,50	2818,52	0,9985	8,50
53	100,00	1057,40	-1,49	1057,40	2685,93	0,9919	7,29
60	100,00	145,10	-2,53	145,10	251,16	0,9999	1,00

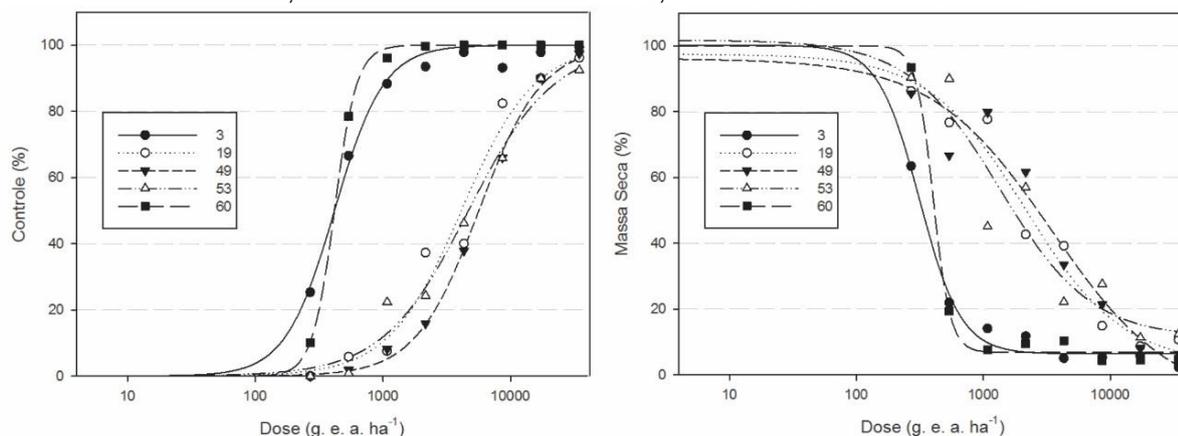
Massa Seca (%)								
População	P <sub>mín</sub>	a	b	c	GR <sub>50</sub>	GR <sub>80</sub>	r <sup>2</sup>	FR
3	7,9	92,07	60,43	0,88	60,43	513,94	0,9895	1,00
19	-16,6	116,60	1.050,80	0,51	1.050,80	4836,08	0,9944	8,18
49	8,7	92,18	561,90	0,98	561,90	4147,77	0,9881	9,47
53	20,1	69,98	995,20	2,82	995,20	11078,27	0,9782	15,06
60	6,2	93,67	116,30	1,48	116,30	379,72	0,9903	1,73

### 2.5.5 Ensaio dose-resposta ao glyphosate – Estádio de 2 a 4 perfilhos (20 a 40 cm)

De maneira semelhante ao observado no primeiro estágio de desenvolvimento do capim-amargoso (estádio de 2 a 4 folhas), no estágio de 2 a 4 perfilhos as populações consideradas resistentes (19, 59, 53) diferiram significativamente das populações consideradas suscetíveis (3 e 60) quando submetidas a aplicação das diferentes doses de glyphosate (Figura 7).

As estimativas para variável controle visual, para o nível de inibição de 50% ( $C_{50}$ ), revelam que as doses necessárias ao controle das populações de *D. insularis* suscetíveis neste estágio de desenvolvimento foram próximas de 418 g. ha<sup>-1</sup>, enquanto o  $C_{50}$  encontrado para as populações resistentes variou de 4125 a 5659 g. ha<sup>-1</sup>. A relação entre essas doses resultou em fatores de resistência que chegaram até 13,54 (Tabela 9).

**FIGURA 7** - CURVAS DE DOSE-RESPOSTA PARA AS VARIÁVEIS CONTROLE (%) E MATÉRIA SECA (%), EM RELAÇÃO À TESTEMUNHA, DE POPULAÇÕES DE *D. INSULARIS* RESISTENTES E SUSCETÍVEIS AO GLYPHOSATE, NO ESTÁDIO DE 2 A 4 PERFILHOS, OBTIDAS AOS 21 DAA DO HERBICIDA.



Adegas et al. (2010), avaliando o resultado da análise conjunta de três estágios de desenvolvimento do capim-amargoso resistente, encontraram valor para o parâmetro  $GR_{50}$  equivalente a 1.660 g. ha<sup>-1</sup>. Apesar dos autores não terem discriminado o parâmetro  $GR_{50}$  em cada um dos estágios de desenvolvimento da planta daninha, é possível que o valor de  $GR_{50}$  muito maior constatado no presente trabalho possa representar a evolução da resistência das populações de *D. insularis*, quando comparado aos resultados obtidos naquele trabalho. Da mesma forma, Melo (2011), avaliando a resistência do capim-amargoso ao glyphosate no estágio de 2 a 3 perfilhos, em uma população resistente coletada em lavoura de citros, encontrou valores aos parâmetros  $C_{50}$  e  $GR_{50}$  de 831,71 e 1051,61, respectivamente.

**TABELA 10** - ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS “A”, “B” E “C” DO MODELO LOG-LOGÍSTICO AJUSTADO EM RESPOSTA À APLICAÇÃO DE GLYPHOSATE NO ESTÁDIO DE 2 A 4 PERFILHOS. DOSES (G E. A. HA<sup>-1</sup>) NECESSÁRIAS AO CONTROLE DE 50% (C<sub>50</sub> OU GR<sub>50</sub>) E 80% (C<sub>80</sub> OU GR<sub>80</sub>) DE POPULAÇÕES DE *D. INSULARIS*, COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO DOS MODELOS (R<sup>2</sup>) E FATOR DE RESISTÊNCIA (FR). OS DADOS FORAM OBTIDOS AOS 21 DAA DO HERBICIDA.

Controle (%)								
População	a	b	c	C <sub>50</sub>	C <sub>80</sub>	r <sup>2</sup>	FR	
3	100,00	418,10	-2,26	418,10	772,57	1,00	1,00	
19	100,00	4125,90	-1,52	4125,90	10253,13	0,99	9,88	
49	100,00	5658,50	-1,75	5658,50	12470,74	1,00	13,54	
53	100,00	4690,80	-1,30	4690,80	13611,54	0,99	11,23	
60	100,00	417,80	-4,96	417,80	552,47	1,00	1,00	
Redução da massa Seca (%)								
População	Pmín	a	b	c	GR <sub>50</sub>	GR <sub>80</sub>	r <sup>2</sup>	FR
3	6,36	93,85	314,30	2,66	331,37	612,49	0,9924	1,00
19	3,15	94,37	2155,50	1,13	2182,26	8285,63	0,9727	6,59
49	-8,54	104,70	3473,00	0,92	2683,00	10088,15	0,9596	8,10
53	11,24	90,55	1354,70	1,21	1723,15	8650,76	0,9283	5,20
60	6,80	93,22	403,80	6,38	413,18	535,56	0,9971	1,25

Os maiores valores obtidos para os parâmetros de controle encontrados no presente trabalho, em contraste com aqueles presentes em literatura, sustentam a hipótese de que as populações de capim-amargoso têm aumentado o nível de resistência ao passar do tempo, muito provavelmente devido à exposição contínua ao herbicida no campo.

A dose máxima encontrada entre as populações necessária ao controle de 80% foi de até 12 vezes a dose comercial do glyphosate, reforçando a hipótese de que a aplicação de glyphosate é considerada prática agrícola insustentável no controle de população de *D. insularis* resistentes nas regiões estudadas, sendo fundamental a adoção de outras medidas para a obtenção de controle satisfatório dessa espécie.

### 2.5.6 Relação entre os estádios de desenvolvimento da *D. insularis*

Considerando-se a relação entre doses necessárias para o controle de 50% e 80% das populações, para as variáveis respostas C e GR, observa-se que foram necessárias doses de 3,5 vezes a mais de glyphosate no estágio de 2 a 4 perfilhos em relação à obtenção do mesmo nível de inibição encontrados nos estádios de 2 a 4 perfilhos para ambas as populações resistentes e suscetíveis (Tabela 10). Este

resultado assemelha-se ao encontrado por Melo (2011), ao identificar que o estágio de desenvolvimento do capim-amargoso no momento da aplicação afeta a eficácia de controle da espécie.

**TABELA11** - RELAÇÃO ENTRE OS VALORES OBTIDOS PARA OS PARÂMETROS DE CONTROLE: C<sub>50</sub> E C<sub>80</sub> E MATÉRIA SECA GR<sub>50</sub> E GR<sub>80</sub>, DO SEGUNDO (2 A 4 PERFILHOS) E PRIMEIRO (2 A 4 FOLHAS) ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DAS POPULAÇÕES DE *D. insularis*. TODOS OS DADOS SÃO REFERENTES AOS 21 DAA DO GLYPHOSATE.

População	Controle (%)		Massa Seca (%)	
	C <sub>50</sub>	C <sub>80</sub>	GR <sub>50</sub>	GR <sub>80</sub>
3	2,73	2,95	4,52	1,19
19	3,22	2,91	3,64	1,71
49	4,59	4,42	3,86	2,43
53	4,44	5,07	1,56	0,78
60	2,88	2,20	3,26	1,41
<b>Média</b>	3,57	3,51	3,37	1,51

Já a razão entre as doses necessárias à redução de massa seca 50 e 80% foi 3,35 e 1,51 vezes a mais no estágio de desenvolvimento mais avançado. Esses índices sugerem que para ambas as populações, resistentes ou suscetíveis, doses maiores são requeridas ao controle da *D. insularis* com o aumento do desenvolvimento da planta daninha. Esse resultado pode estar relacionado com a maior quantidade de tecido foliar formado e, conseqüentemente, maior quantidade da enzima EPSPS presente nos tecidos da planta. Outra possibilidade poderia ser atribuída ao desenvolvimento da cutícula foliar se tornar mais espessa em estádios de desenvolvimento mais avançados, representando dessa forma uma barreira mais expressiva à absorção do herbicida.

## 2.6 CONCLUSÃO

Em 100% dos casos, as populações de *D. insularis* coletadas nos estados do Paraná e São Paulo, em áreas com suspeita de resistência aos herbicidas, apresentaram baixa sensibilidade ao glyphosate; por outro lado, todas as populações de *D. insularis* manifestaram alta sensibilidade ao clethodim.

O fator de resistência (FR) máximo das populações de *D. insularis* encontrado foi 15 para ambos os estádios de desenvolvimento em estudo.

Em geral, são necessárias doses de até 3,5 vezes a mais de glyphosate para o controle da *D. insularis* no estágio de 2 a 4 perfilhos quando comparado ao estágio de 2 a 4 folhas para ambas as populações, resistentes ou suscetíveis.

## REFERÊNCIAS

- ADEGAS, F. S. et al. Diagnóstico da existência de *Digitaria insularis* resistente ao herbicida glyphosate no sul do Brasil. **XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS 19 A 23 DE JULHO DE 2010 - CENTRO DE CONVENÇÕES - RIBEIRÃO PRETO – SP**. Ribeirão Preto, p. 761-765. jun. 2010.
- ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE MALEZAS. Recomendaciones sobre unificación de los sistemas de evaluación en ensayos de control de malezas. **ALAM**, v. 1, n. 1, p. 35-38, 1974.
- BELZ, R. G. Is hormesis an underestimated factor in the development of herbicide resistance? **26th German Conference On Weed Biology An Weed Control**, Braunschweig, v. 444, n. 443, p.81-91, 2014.
- BROOKES, G.; BARFOOT, P. **GM crops: global socio-economic and environmental impacts 1996- 2014**. Dorchester:Pg Economics Ltd, UK, 2016.198p.
- BURGOS, N. R. et al. Review: Confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. **Weed Science**, v. 61, n. 01, p.4-20, 2013.
- CARVALHO, S. J. P. et al. Curvas de dose-resposta para avaliação do controle de fluxos de emergência de plantas daninhas pelo herbicida imazapic. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n. 3, p.535-542, 2005.
- CARVALHO, L. B. de et al. Detection of sourgrass (*Digitaria insularis*) biotypes resistant to glyphosate in Brazil. **Weed Science**, v. 59, n. 02, p.171-176, jun. 2011.
- CHRISTOFFOLETI, P. J. Curvas de dose-resposta de biótipos resistente e suscetível de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da ALS. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 3, p.513-519, 2002.
- CTNBIO. **Liberações Comerciais**. Disponível em: <[http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial?p\\_p\\_id=110\\_INSTANCE\\_SqhWdohU4BvU&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal\\_U\\_fileEntryId=2061402#/liberacao-comercial/consultar-processo](http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial?p_p_id=110_INSTANCE_SqhWdohU4BvU&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal_U_fileEntryId=2061402#/liberacao-comercial/consultar-processo)>. Acesso em: 01 mar. 2017.
- DUKE, S. O; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, v. 64, n. 4, p.319-325, 2008.
- HALL, L.M.; STROMME, K.M.; HORSMAN, G.P. Resistance to acetolactate synthase inhibitors and quinclorac in a biotype of false cleavers (*Galium spurium*). **Weed Science**, v.46, n.4, p.390-396, 1998.
- HEAP, I. **Herbicide Resistant Sourgrass Globally (*Digitaria insularis*)**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/Summary/Species.aspx>>. Acesso em: 01 jan. 2017.
- HEAP, I. **GROUP G/9 RESISTANT SOURGRASS (*Digitaria insularis*)**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/Details/Case.aspx?ResistID=5350>>. Acesso em:

05 fev. 2017.

GEMELLI, A. et al. Aspectos da biologia de *Digitaria insularis* resistente ao glyphosate e implicações para o seu controle. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 11, n. 2, p.231-240, 10 ago. 2012.

GOMPERTZ, B. "On the Nature of the Function Expressive of the Law of Human Mortality, and on a New Mode of Determining the Value of Life Contingencies." **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, vol. 115, 1825, p. 513–583.

LOPEZ-OVEJERO, R. F. et al. Frequency and dispersal of glyphosate-resistant sourgrass (*Digitaria insularis*) populations across brazilian agricultural production areas. **Weed Science**, v. 65, n. 02, p.285-294, 23 jan. 2017.

KISSMANN, K.G., GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira, 606p., 1992.

MELO, M. S. **Alternativas de controle, acúmulo de chiquimato e curva de crescimento de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) suscetível e resistente ao glyphosate**. 2011. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia (Fototecnia), Universidade Estadual de São Paulo, Esalq, USP, Piracicaba, 2012.

MENDONÇA, G. S. et al. Ecophysiology of seed germination in *Digitaria insularis* (L.) Fedde. **Revista Ciência Agrônômica**, [s.l.], v. 45, n. 4, p.823-832, dez. 2014.

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.

NICOLAI, et. al. 2010. Monitoramento de infestações de populações de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) suspeitas de resistência ao glifosato. In: XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS. **Resumos...**Ribeirão Preto, jul. 2010. p. 200.

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

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

SYSTAT. **Systat Software Products**. Disponível em: <<https://systatsoftware.com/products/>>. Acesso em: 11 fev. 2017.

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

VELINI, E.D. **Estudos e desenvolvimento de métodos experimentais e amostrais adaptados à matologia**. 1995. 250f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 1995.

## 3 CAPÍTULO 2

### AS FORMULAÇÕES DE GLYPHOSATE E OS ADJUVANTES INTERFEREM NA TECNOLOGIA DE APLICAÇÃO, NA ABSORÇÃO DO HERBICIDA E NO CONTROLE DE *Digitaria insularis* (L.)?

#### 3.1 RESUMO

As formulações de herbicidas e os adjuvantes são fatores que podem interagir, otimizando o controle de plantas daninhas. Objetivou-se com este trabalho avaliar a influência de formulações de glyphosate e adjuvantes sobre variáveis relacionadas à tecnologia de aplicação, à fitointoxicação, à interação entre o depósito da calda e o alvo e ao controle de *Digitaria insularis*. Sete ensaios, envolvendo quinze variáveis, foram conduzidos em laboratório e casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado. Os tratamentos foram organizados em arranjo fatorial 2x5+1: duas formulações de glyphosate (SL e WG), cinco combinações (sem adjuvante, adjuvantes éster metílico de óleo de soja, óleo mineral, alquil éster etoxilado, polioxietileno alquilfenol éter), mais uma testemunha (água). A caracterização da tecnologia de aplicação foi feita por meio da avaliação do tamanho das gotas, deposição da pulverização e tensão superficial da calda herbicida. A fitointoxicação foi analisada com base em imagens da microestrutura foliar e medição da espessura dos tecidos internos à folha (espessura total, epiderme adaxial, mesófilo e epiderme abaxial), aos 4 dias após a aplicação dos tratamentos (4 DAA). A interação entre o depósito da calda e o alvo foi avaliada pelo ângulo de contato das caldas em superfície natural e artificial (5 e 30 s após a deposição da gota sobre a superfície), absorção do glyphosate e determinação simultânea do ácido chiquímico acumulado [24 horas após a aplicação do herbicida (HAA)]. Além disso, foram realizadas avaliações dos sintomas visuais de controle e redução da matéria seca, aos 21 DAA. A análise multivariada de componentes principais (ACP) foi utilizada para verificação dos efeitos gerais dos tratamentos sobre as variáveis. Os resultados revelaram que os adjuvantes são os fatores que exercem maior influência sobre as variáveis da tecnologia de aplicação, interação depósito-alvo, sendo o óleo mineral e alquil éster etoxilado considerados mais eficientes, com maior potencial de controle da *D. insularis* e menor risco de deriva, quando associado ao glyphosate.

**Palavras-chave:** capim amargoso, tamanho de gotas, tensão superficial, ângulo de contato, microestrutura foliar, ácido chiquímico.

## DOES GLYPHOSATE FORMULATIONS AND ADJUVANTS AFFECT IN APPLICATION TECHNOLOGY, UPTAKE OF THIS HERBICIDE AND CONTROL OF *Digitaria insularis* (L.)?

### 3.2 ABSTRACT

Herbicide formulations and adjuvants are factors that may interact to optimization of weed control. The objective of this work was to evaluate the influence of glyphosate and adjuvant formulations on variables related to the application technology, to phytointoxication, to interaction between the deposit of the spray solution and the target, and control of *Digitaria insularis*. Seven trials, involving fifteen variables, were conducted in a laboratory and greenhouse, in a randomized completely design. The treatments were arranged factorial scheme  $2 \times 5 + 1$ : two glyphosate formulations (SL and WG), five combinations (without adjuvant, adjuvants soybean oil methyl ester, mineral oil, ethoxylated alkyl ester, polyoxyethylene alkylphenol ether) plus one control (water). The characterization of the application technology was done through the evaluation of the of droplet spectra, spray deposition and surface tension of the herbicide spray solution. Phytotoxification was analyzed based on images of the foliar microstructure and measurement of the leaf internal tissues (total thickness, adaxial epidermis, mesophyll and abaxial epidermis thickness), 4 days after application of the treatments (4 HAA). The interaction between the deposit of the spray solution and the target was evaluated based on the contact angle of droplet on natural and artificial surface (5 and 30s after drop deposition on surface), glyphosate absorption and determination simultaneous of accumulated shikimic acid [24 hours after application of the herbicide (HAA)]. In addition, the visual symptoms of dry matter control and reduction were evaluated at 21 DAA. The multivariate analysis of the principal components (PCA) was used to verify the general effects of treatments on variables, as well as to study the correlation between them. The results revealed that the adjuvants are the factors that have the greatest influence on variables of application technology characterization and target-deposit interaction, being the mineral oil and alkyl ester ethoxylate considered more efficient, with a greater control potential of *D. insularis* and lower drift risk when associated to glyphosate.

**Keywords:** sourgrass, droplets spectra, surface tension, contact angle, leaf foliar

microstructure, shikimic acid.

### 3.3 INTRODUÇÃO

A *Digitaria insularis*, conhecida popularmente como capim-amargoso, é uma espécie daninha perene, nativa de regiões tropicais e subtropicais (MACHADO et al., 2008), de grande importância nas condições agrícolas brasileiras, pelas perdas geradas pela mato-competição exercida por essa espécie. Preocupações com o controle dessa planta daninha tornaram-se frequentes após a constatação do desenvolvimento da resistência ao herbicida glyphosate, em 2005 (HEAP, 2017).

O glyphosate, N-(fosfometil) glicina, é o principal herbicida utilizado no controle de *D. insularis*, com atuação relacionada ao bloqueio da rota da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fostado sintase (EPSPS) (AMRHEIN et al. 1980), proporcionando acúmulo do ácido chiquímico e reduzindo a síntese de aminoácidos aromáticos, hormônios e compostos fenólicos (DILL, 2005), essenciais ao crescimento e desenvolvimento da planta.

As características físico-químicas dos herbicidas como a lipofilicidade (Kow) e a constante de dissociação ácida (pKa) são determinantes na absorção e eficácia de controle das plantas daninhas. O glyphosate é um herbicida que em água possui comportamento ácido fraco, com quatro constantes de dissociação variável (pKa entre 2,6 a 10,3) que apresenta absorção celular facilitada por meio de carreadores de fosfato presentes nas membranas celulares (DENIS E DEROT, 1993; MORIN et al., 1997). Sua alta solubilidade em água e baixa afinidade à lipídeos (log Kow -6 a -1,7) (RODRIGUES E ALMEIDA, 2013) fazem com que a molécula do herbicida possua baixa capacidade de penetração nas cutículas vegetais, principalmente aquelas com elevada composição cerosa.

As diferenças entre a composição e a concentração dos compostos químicos da cutícula foliar, bem como os demais atributos físicos, podem estar relacionados a maior tolerância das espécies de plantas daninhas ao glyphosate (CHACHALIS et al., 2001). Os estudos anatômicos com *D. insularis* mostraram que essa espécie apresenta uma compacta camada cerosa que reveste toda a superfície foliar (BARROSO, 2011) e um baixo índice estomático presente na superfície adaxial da folha (MACHADO, 2008), onde a deposição da pulverização tende a se concentrar.

Por isso, é fundamental que o herbicida seja formulado dentro de uma

composição que possa auxiliar a molécula penetrar na cutícula vegetal, de forma a aumentar o aproveitamento do ingrediente ativo. Existe no mercado um número bastante expressivo de formulações que apresentam diferenças quanto aos seus componentes, como o tipo de sal utilizado, concentração do ingrediente ativo, concentração e qualidade dos adjuvantes presentes (BAUR E APONTE, 2014). Assim, espera-se que tais diferenças na composição das formulações possam refletir em mudanças no aproveitamento do herbicida e respectivo controle das plantas daninhas.

Os adjuvantes adicionados à mistura em tanque também podem interagir com as formulações de herbicidas para a melhoria da eficácia de controle de plantas daninhas (BRATHUHN e PETERSEN, 2014). Esses produtos apresentam diferenças quanto à sua ação, sendo alguns mais voltados à melhoria das caldas de aplicação, denominados modificadores ou utilitários, e outros sendo associados às mudanças na performance dos ingredientes ativos, classificados como ativadores (ROMAN, 2007).

Em relação aos adjuvantes ativadores, os efeitos na tensão superficial e viscosidade dos líquidos podem proporcionar mudanças no tamanho das gotas (OLIVEIRA et al., 2015; COSTA et al., 2017) e assim influenciar diretamente o depósito da calda pulverizada. Outros processos como o espalhamento das gotas na superfície alvo, a retenção do ingrediente ativo e os efeitos na solubilização e/ou desarranjo da camada cuticular podem interagir de forma a aumentar a quantidade do herbicida absorvido (BAUR E APONTE, 2014) ou ainda modificar a sua taxa de absorção, otimizando assim o controle da planta daninha.

Na maior parte dos trabalhos que estudam os efeitos de formulações e adjuvantes, geralmente tem-se avaliado um número restrito de variáveis que não proporcionam o entendimento completo dos diversos efeitos que podem ser proporcionados pelas características das caldas de aplicação, com implicações no controle de plantas daninhas.

Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a influência de formulações de glyphosate e adjuvantes sobre um conjunto de variáveis relacionadas à tecnologia de aplicação, à fitointoxicação, à interação entre o depósito da calda e o alvo, e ao controle de *Digitaria insularis*.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Sete ensaios foram realizados para avaliar a influência de formulações de glyphosate e adjuvantes sobre o tamanho de gotas, deposição da pulverização e o controle de populações de *D. insularis*. Para a melhor organização e discussão dos dados, os experimentos com características similares foram agrupados, atribuindo-se as seguintes denominações: (1) caracterização da tecnologia de aplicação e (2) Interação entre o depósito da calda e a planta alvo (interação depósito-alvo) e (3) controle de *D. insularis*.

Todos os ensaios seguiram o delineamento experimental inteiramente casualizado. Os tratamentos foram organizados em arranjo fatorial 2x5+1, sendo duas formulações de glyphosate (sal de isopropilamina e sal de amônio), cinco combinações [sem adjuvante, adjuvantes polioxietileno alquilfenol éter (Iharaguen-s<sup>®</sup>), óleo mineral (Nimbus<sup>®</sup>), alquil ester etoxilado de ácido fosfórico (Lanzar<sup>®</sup>) e éster metílico de óleo de soja (Aureo<sup>®</sup>)] mais um tratamento controle (água), totalizando 11 tratamentos (Tabela 11). As formulações de glyphosate foram aplicadas na dose de 1080 g e.a.ha<sup>-1</sup> e os adjuvantes foram adicionados às caldas de pulverização seguindo a dose recomendada pelo fabricante, conforme a Tabela 11.

**TABELA 12** - TRATAMENTOS DOS ENSAIOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DA TECNOLOGIA DE APLICAÇÃO. FORMULAÇÕES DE GLYPHOSATE (I.A. E FORMULAÇÃO) E ADJUVANTES, COM RESPECTIVA DOSE (G E.A. HA<sup>-1</sup>; V.V<sup>-1</sup> DE PRODUTO COMERCIAL).

Formulação	Adjuvante	Doses (g e.a.ha <sup>-1</sup> +v.v <sup>-1</sup> )
1 -	-	-
2 - Sal isopropilamina (SL <sup>1</sup> )	-	1080
3 - Sal isopropilamina (SL)	Aureo <sup>®</sup>	1080 + 0,1 (%)
4 - Sal isopropilamina (SL)	Nimbus <sup>®</sup>	1080 + 0,5 (%)
5 - Sal isopropilamina (SL)	Lanzar <sup>®</sup>	1080 + 0,5 (%)
6 - Sal isopropilamina (SL)	Iharaguen-s <sup>®</sup>	1080 + 0,01 (%)
7 - Sal amônio (WG <sup>2</sup> )	-	1080
8 - Sal amônio (WG)	Aureo <sup>®</sup>	1080 + 0,1 (%)
9 - Sal amônio (WG)	Nimbus <sup>®</sup>	1080 + 0,5 (%)
10 - Sal amônio (WG)	Lanzar <sup>®</sup>	1080 + 0,5 (%)
11 - Sal amônio (WG)	Iharaguen-s <sup>®</sup>	1080 + 0,01 (%)

<sup>1</sup>SL=Roundup Original<sup>®</sup>; <sup>2</sup>WG=Roundup WG<sup>®</sup>

Os ensaios pertencentes aos grupos 2 e 3 foram conduzidos em casa de vegetação, no Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências

Agronômicas, FCA/UNESP, Campus de Botucatu, SP (22°50'41.20"S; 48°26'6.65"O). A população de *D. insularis* foi coletada terreno baldio, localizado no município de Avaré (23°50'81'84" ; 04882'43,53"), sendo esta correspondente a população 60, caracterizada como suscetível, conforme apresentado no capítulo 1 (Subitem 2.5.5). A *D. insularis* foi semeada em vasos de polietileno com capacidade de 1 L e preenchidos com substrato comercial (Carolina Soil®) até atingirem o estágio de desenvolvimento de 2 a 4 perfilhos (20 a 40 cm).

### 3.4.1 Caracterização da tecnologia de aplicação

Três ensaios foram realizados para caracterizar o efeito das formulações de glyphosate e dos adjuvantes sobre as seguintes variáveis: (a) tamanho de gotas, (b) tensão superficial e (c) depósito de pulverização. Os ensaios “a” e “b” foram realizados em laboratório pertencente ao Núcleo de Estudos e Desenvolvimento em Tecnologia de Aplicação - NEDTA, do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal – SP.

**Tamanho de gotas:** O tamanho das gotas de pulverização foi avaliado pela técnica de difração da luz laser seguindo a mesma metodologia empregada por Costa et al. (2017). Foram utilizados três exemplares de pontas de pulverização de jato plano do tipo AXI 11003 (Jacto®) como unidades experimentais. Cada unidade experimental foi representada por quatro leituras. A pulverização foi regulada para operar na pressão de 200 kPa, fornecendo vazão de 0,83 L.min<sup>-1</sup>. Para a comparação dos tratamentos foram considerados os seguintes parâmetros: porcentagem de volume com gotas menores do que 100 µm [(G<100µm (%))], diâmetro mediano volumétrico (DMV) e coeficiente de uniformidade (Coef. unif%), calculado de acordo com a equação 1 (E1):

$$\text{Coef. unif (\%)} = \frac{Dv_{0,9} - Dv_{0,1}}{DMV} \quad (E1)$$

Dv<sub>0,1</sub>; DMV e Dv<sub>0,9</sub> referem-se aos diâmetros das gotículas (µm), em que 10, 50 e 90% do volume acumulado são compostos por gotículas de diâmetro menor do que o respectivo valor do parâmetro.

**Depósito da pulverização:** O depósito da pulverização foi avaliado pelo uso do marcador corante alimentício Azul Brilhante (catalogado internacionalmente pela

“Food, Drug & Cosmetic” como FD&C Blue n.1) na concentração de 0,15%, seguindo metodologia descrita por Palladini et al. (2005). O depósito da pulverização foi avaliado em 14 repetições, representadas por vasos contendo três plantas de *D. insularis* cada. Imediatamente após a aplicação, as plantas foram cortadas junto à superfície do solo e armazenadas em sacos de polietileno para posteriormente serem lavadas com 100 mL de água destilada. As plantas foram então levadas para secar em estufa de circulação de ar forçada, sob temperatura de 70°C, até que atingissem massa constante. Em seguida, as plantas foram pesadas em balança analítica de precisão. As leituras da concentração do marcador presentes nas soluções de lavagens foram feitas utilizando-se espectrofotômetro (modelo Shimadzu UV 1601 PC), sendo as medidas de depósito transformadas para serem expressas em  $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$  de matéria seca.

**Tensão superficial:** A partir das caldas de aplicação, descritas na tabela 1, foi feita a análise da tensão superficial do líquido pelo método da gota pendente. Os procedimentos experimentais utilizados seguiram a mesma metodologia descrita por Decaro et al. (2015). Quatro gotas representaram as unidades experimentais de cada tratamento. O software foi programado para realizar uma leitura por segundo num tempo total de 60 s. Para a comparação dos tratamentos foram consideradas apenas as leituras obtidas aos 5 e 30 segundos, após a formação da gota, coincidindo a última leitura com o ponto de inflexão da curva, quando foi observado a medida mínima de tensão superficial, entre os diferentes tratamentos.

### 3.4.2 Interação depósito-alvo

Quatro ensaios foram realizados para a avaliação da interação depósito-alvo com as variáveis: (a) ângulo de contato; (b) fitotoxicidade; (c) absorção de glyphosate e determinação simultânea do ácido chiquímico acumulado.

**(a) Ângulo de contato:** O ângulo de contato das gotas formadas a partir das diferentes soluções foi analisado em superfície natural (*D. insularis* R e S) e artificial (parafilme), sendo a última superfície tomada como padrão. Os métodos experimentais foram os mesmos descritos por Decaro et al. (2015), onde um dispositivo responsável pela produção das gotas, a partir do pressionamento do

êmbolo de uma seringa, foi programado para formar gotas com volume de 3  $\mu$ L. As leituras foram realizadas imediatamente após a colocação da gota sobre a superfície adaxial de folhas frescas, recentemente destacadas de plantas de *D. insularis*. A porção mediana das folhas mais jovens, completamente expandidas e visualmente saudáveis, foi tomada como referência para a comparação entre os tratamentos, tendo-se o cuidado em colocar a gota entre duas nervuras secundárias das folhas. O software foi programado para realizar uma leitura por segundo num tempo total de 60 s. As unidades experimentais foram representadas por quatro plantas provenientes de vasos distintos. As leituras da tensão superficial foram feitas dentro de um intervalo de 60 segundos. Para a comparação dos tratamentos foram consideradas apenas a leitura obtidas aos 5 e 30 segundos, após o depósito das gotas das soluções sobre as superfícies alvo.

**(b) Fitointoxicação:** Dois ensaios, semeados em 15 de dezembro de 2015, foram conduzidos para avaliar os efeitos qualitativos do herbicida na superfície foliar e efeitos quantitativos nos tecidos internos de plantas de *D. insularis*. Para isso, foram utilizadas duas técnicas: microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de luz (ML). Os ensaios foram realizados no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agropecuária (NAP/MEPA) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/ESALQ). Neste ensaio, quatro vasos contendo três plantas cada, correspondiam às repetições. As plantas que receberam aplicação em laboratório foram transferidas para casa de vegetação, sendo deixadas por um intervalo de 48 horas. Após esse período, fez-se o corte, com lâmina metálica, de quatro fragmentos foliares de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup>. As amostras foliares foram removidas de plantas provenientes de diferentes vasos. A parte mediana da folha mais jovem, completamente expandida e visualmente sadia foi utilizada como amostra. Após o corte, os fragmentos foram colocados em eppendorfs de 2 mL de capacidade, contendo solução fixadora de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965). A preparação amostral para a leitura em microscópio eletrônico de varredura (LEO model 435-VPV) e microscópio de luz (modelo AX70RF; Olympus Optical, Tokyo, Japan), bem como os demais procedimentos seguiram a metodologia descrita por Santos et al. (2015).

**(c) Absorção de glyphosate e ácido chiquímico acumulado:** O ensaio para

quantificação dos referidos compostos foi realizado no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM) da FCA/UNESP, Campus de Botucatu, SP. A semeadura da *D. insularis* e a aplicação dos tratamentos foram realizadas nos dias 01/07/2016 e 16/08/2016, respectivamente. O glyphosate absorvido e o ácido chiquímico foram quantificados simultaneamente por técnica de cromatografia e espectrometria de massas (LC-MS/MS).

Cada tratamento foi representado por vasos contendo três plantas cada, em cinco repetições. Após a aplicação dos tratamentos, as plantas foram deixadas por 24 horas em casa de vegetação. Em seguida, foram cortadas rente à superfície do solo e armazenadas em sacos de polietileno, previamente identificados. O glyphosate presente na superfície das plantas foi removido por meio da lavagem com 300 mL de água destilada, adicionada em três vezes de 100 mL. As amostras foram então levadas para secar em estufa, com circulação de ar forçada, a  $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ , até que atingissem massa constante. Logo em seguida, as plantas foram armazenadas em freezer até serem maceradas utilizando-se nitrogênio líquido. Os demais procedimentos utilizados nesse ensaio seguiram à metodologia descrita por Gomes et al. (2015).

### **3.4.3 Controle de *D. insularis***

As avaliações de controle foram feitas como base nos sintomas visuais e na massa seca residual, aos 21 DAA. Para isso, foi utilizada escala de notas atribuindo-se valores que variaram entre 0% (ausência de sintomas) e 100% (morte das plantas), conforme Asociación Latinoamericana de Malezas (1974). As plantas foram então cortadas rente à superfície do solo e armazenadas em sacos de papel devidamente identificados. Posteriormente, foram levadas para secagem em estufa de circulação de ar forçada, sob temperatura de  $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ , até que atingissem massa constante. Em seguida, as plantas foram pesadas em balança analítica de precisão e os dados foram utilizados para cálculo da porcentagem de massa seca, em relação à testemunha (sem aplicação).

### **3.4.4 Análise estatística dos dados**

Inicialmente, os dados foram submetidos aos testes de Levene ( $P>0,05$ ) e Shapiro Wilk ( $P>0,05$ ), para a verificação da homocedasticidade e normalidade dos

erros. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância e aplicação do teste F. Quando verificada a existência de diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ).

Visando estudar a importância e a relação entre as variáveis-respostas, juntamente com a análise dos efeitos proporcionados pelos tratamentos, os dados das variáveis coletadas para tecnologia de aplicação e estudo da interação depósito-alvo foram padronizados e analisados separadamente pela análise de componentes principais (ACP), utilizando para isso, matriz de correlação entre as variáveis, considerando-se como satisfatório o valor mínimo de 80% para a variação acumulada dos dados (CRUZ et al., 2012). Por fim, foi aplicado o teste de correlação de Pearson ( $P < 0,05$ ) para a verificação da significância na associação entre as variáveis.

### 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.5.1 Tecnologia de Aplicação

Na Tabela 12 são mostrados os valores de F das análises de variância e as suas respectivas significâncias para as diferentes variáveis relacionadas à tecnologia de aplicação. Observa-se que as formulações influenciaram apenas as variáveis gotas menores que  $100 \mu\text{m}$  ( $G < 100 \mu\text{m}$ ) e tensão superficial aos 30 s após a formação da gota (TS 30s).

**TABELA 13** - VALORES DE F DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE GOTAS MENORES DO QUE  $100 \mu\text{m}$  ( $G < 100 \mu\text{m}$ ), DIÂMETRO MEDIANO VOLUMÉTRICO - DMV ( $\mu\text{m}$ ), COEFICIENTE DE UNIFORMIDADE (COEF), DEPÓSITO DA PULVERIZAÇÃO ( $\mu\text{L.G}^{-1}$ ) E TENSÃO SUPERFICIAL – TS ( $\text{MN.M}^{-1}$ ) AOS 5 E 30 S APÓS A FORMAÇÃO DA GOTA PENDENTE.

Causa de Var.	G<100 $\mu\text{m}$	DMV	Coef.	Depósito	TS 5s	TS 30s
Formulação (F)	6,83*	2,46 <sup>NS</sup>	2,85 <sup>NS</sup>	0,74 <sup>NS</sup>	0,62 <sup>NS</sup>	4,58*
Adjuvante (A)	359,26**	144,97**	18,79**	1,47 <sup>NS</sup>	177,32**	209,70**
F <sub>FxA</sub> <sup>1</sup>	29,81**	4,54**	1,01 <sup>NS</sup>	3,85**	21,31**	14,06**
F <sub>fat.xTest.</sub> <sup>2</sup>	3,96 <sup>NS</sup>	9,23**	10,96**	24,78**	4238,05**	1101,16**
CV(%) <sup>3</sup>	4,25	3,31	2,31	36,85	1,63	1,73

\*\*Significativo a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); \*Significativo a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )

<sup>1</sup>Interação entre os fatores formulação e adjuvante; <sup>2</sup>Comparação do fatorial com a Testemunha;

<sup>3</sup>Coeficiente de variação (%).

Notavelmente, devido aos maiores valores de F obtidos para o fator adjuvante, percebe-se que este fator exerce maior influência sobre as variáveis da tecnologia de aplicação, não sendo constatada diferença significativa apenas para o depósito

da pulverização. A interação significativa entre os fatores revela a existência de dependência entre a formulação e adjuvante para a maior parte das variáveis estudadas. Não foi encontrada diferença significativa entre a testemunha e os fatores, apenas para a variável  $G < 100 \mu\text{m}$ .

A comparação entre as médias dos tratamentos para as variáveis relacionadas ao tamanho de gotas e depósito da pulverização encontra-se na Figura 8. Verificou-se que os adjuvantes à base de alquil éster etoxilado (Lanzar<sup>®</sup>) e óleo mineral (Nimbus<sup>®</sup>), quando adicionados a formulação SL, proporcionaram redução de 39 e 55 % da porcentagem de gotas menores do que  $100 \mu\text{m}$  ( $G < 100 \mu\text{m}$ ) e aumento de 14 e 34% do diâmetro mediano volumétrico (DMV), em relação à aplicação da formulação isolada (sem adição de adjuvantes). No entanto, quando os mesmos adjuvantes foram adicionados à formulação WG, a redução da variável  $G < 100 \mu\text{m}$  foi de 52 e 53% e o incremento no DMV correspondeu a 32 e 48%, respectivamente, em relação à formulação sem a adição de adjuvantes (Figura 8A e 8B). Assim como identificado por Hilz; Vermeer (2013), Oliveira et al. (2015) e Miller; Stoughton (2000) as menores porcentagens de gotas inferiores a  $100 \mu\text{m}$  apresentam menor potencial risco de deriva aos tratamentos. Ainda, é possível notar que os tratamentos com a adição do adjuvante à base de polioxietileno alquilfenol éter (Iharaguen-s<sup>®</sup>) não apresentaram diferença significativa em relação aos tratamentos com as formulações herbicidas sem adjuvantes. Dessa forma, este adjuvante é indicado para prevenção da deriva em pulverizações quando adicionado ao glyphosate.

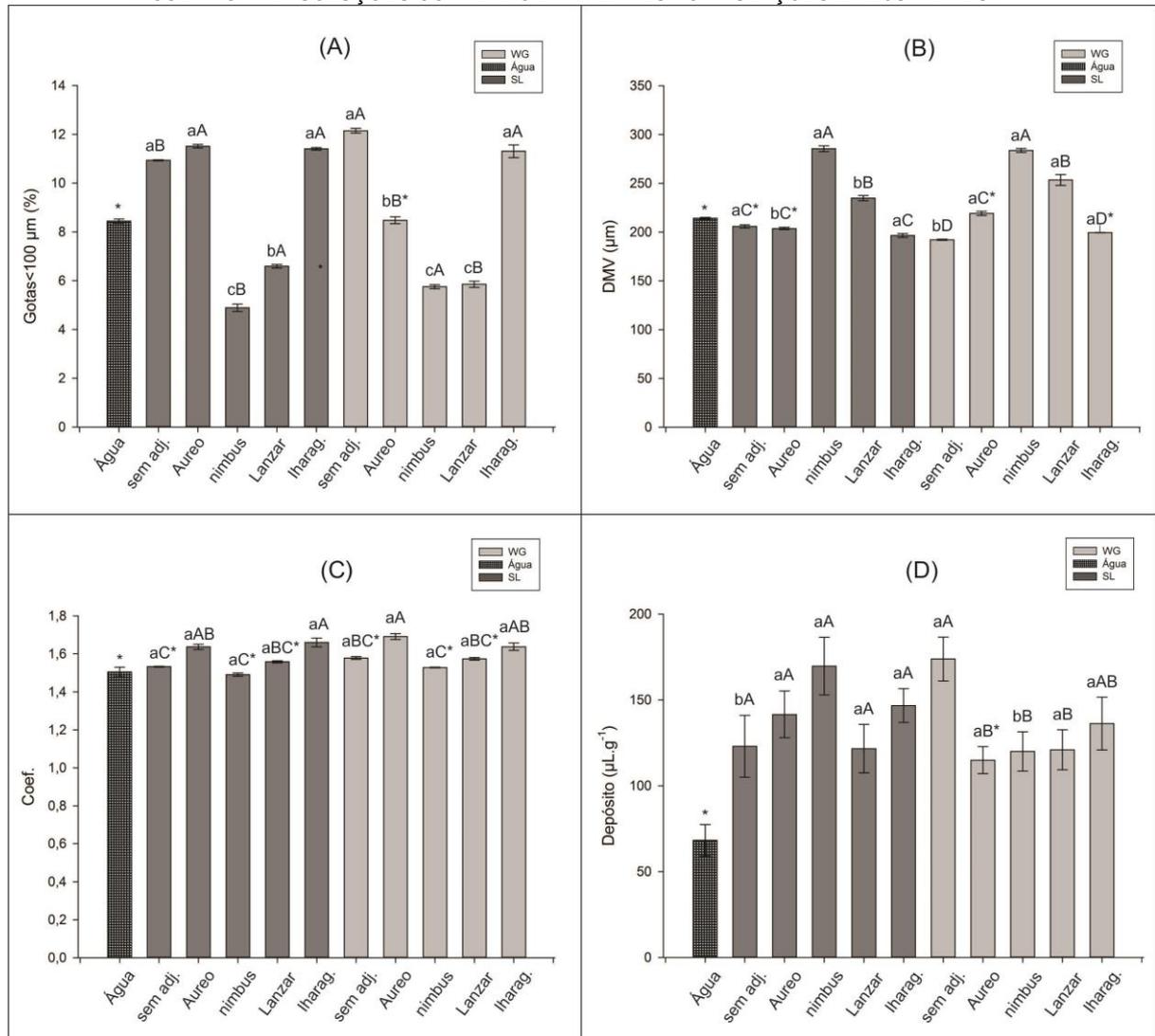
Ao comparar as formulações herbicidas, as diferenças significativas encontradas entre os tratamentos foram mais sutis. Na comparação entre as formulações, sem a adição de adjuvante, a formulação SL apresentou aproximadamente 10% a menos de  $G < 100 \mu\text{m}$  e aumento de 7% do DMV, em comparação à formulação WG. A maior diferença encontrada entre as formulações foi quando estas foram combinadas ao adjuvante Aureo<sup>®</sup>, com o qual a formulação WG apresentou 26% a menos da variável  $G < 100 \mu\text{m}$ , e 7,55% a mais do valor do DMV, o que evidencia a existência da dependência entre os fatores formulação e adjuvante.

A comparação do coeficiente de uniformidade das gotas de pulverização – Coef (Figura 8C) entre que os tratamentos revelam que a adição dos adjuvantes Nimbus<sup>®</sup> e Lanzar<sup>®</sup> proporcionaram valores menores em relação aos demais tratamentos, indicando maior homogeneidade do tamanho de gotas e, reduzindo-se assim, a produção de gotas muito finas, suscetíveis à deriva. Ainda cabe destacar que, as

misturas com adição dos adjuvantes Aureo<sup>®</sup> e Iharaguen-s<sup>®</sup> apresentam maior heterogeneidade do tamanho de gotas, quando comparadas à testemunha.

Em relação ao depósito da pulverização (Figura 8D), observa-se que praticamente todos os tratamentos que continham o herbicida apresentaram incrementos significativos da quantidade do depósito da pulverização em relação à testemunha (água), indicando a influência dos fatores estudados no incremento dos valores dessa variável.

**FIGURA 8** - VALORES (MÉDIAS ± EP) DAS VARIÁVEIS: (A) PORCENTAGEM DE GOTAS MENORES DO QUE 100  $\mu\text{M}$  ( $G < 100 \mu\text{M}$ ), (B) DIÂMETRO MEDIANO VOLUMÉTRICO - DMV ( $\mu\text{M}$ ); (C) COEFICIENTE DE UNIFORMIDADE (COEF.) E (D) DEPÓSITO DA PULVERIZAÇÃO ( $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ ) EM PLANTAS DE *D. INSULARIS* PARA SOLUÇÕES CONTENDO DIFERENTES FORMULAÇÕES E ADJUVANTES.



Letras minúsculas comparam às formulações, dentro de cada adjuvante e letras maiúsculas comparam adjuvantes, dentro de cada formulação. Tratamentos com letras iguais, na comparação de cada fator, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). (\*) Indica semelhança dos tratamentos em relação à testemunha (controle) pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

A comparação das formulações, sem a adição de adjuvantes à calda, indicou haver maior quantidade de depósito da pulverização com a formulação WG, comparada à formulação SL. Esse fato, provavelmente está relacionado com a maior remoção dos depósitos da superfície foliar com a formulação WG em relação à SL, a qual é aquosa e pela dificuldade de extração da substância marcadora somente com água. Também pode-se notar diferença significativa nos valores de depósito entre as formulações quando foram combinadas ao adjuvante Nimbus®, com o qual a formulação S apresentou maior quantidade de depósito em comparação com a formulação WG, o que pode ser explicado pela maior afinidade entre produtos oleosos.

Em relação ao efeito dos adjuvantes no depósito da pulverização, os resultados revelam a ausência de diferenças significativas nas associações com a formulação S, enquanto na formulação WG, as pulverizações sem associação aos adjuvantes proporcionaram maiores níveis de depósito em comparação aos tratamentos que receberam adição dos adjuvantes (Figura 8D). Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Decaro et al. (2016). Esses autores constataram que a adição de adjuvantes a soluções contendo inseticidas e fungicidas mostrou efeito inversamente proporcional ao depósito da pulverização, em relação à aplicação dos produtos fitossanitários sem a combinação com adjuvantes. Por outro lado, Bueno et al. (2013), estudando o efeito do adjuvante nonilfenol etoxilado adicionado às caldas contendo glyphosate, não encontraram diferenças entre o depósito da pulverização em plantas daninhas.

Nesses trabalhos, evidencia-se que diferentes naturezas do produto químico e adjuvante (oleoso ou não), bem como a interação herbicida, adjuvante e superfície foliar podem interferir na quantidade de depósito em testes com avaliações quantitativas em que se preconiza a remoção dos depósitos da superfície por lavagem.

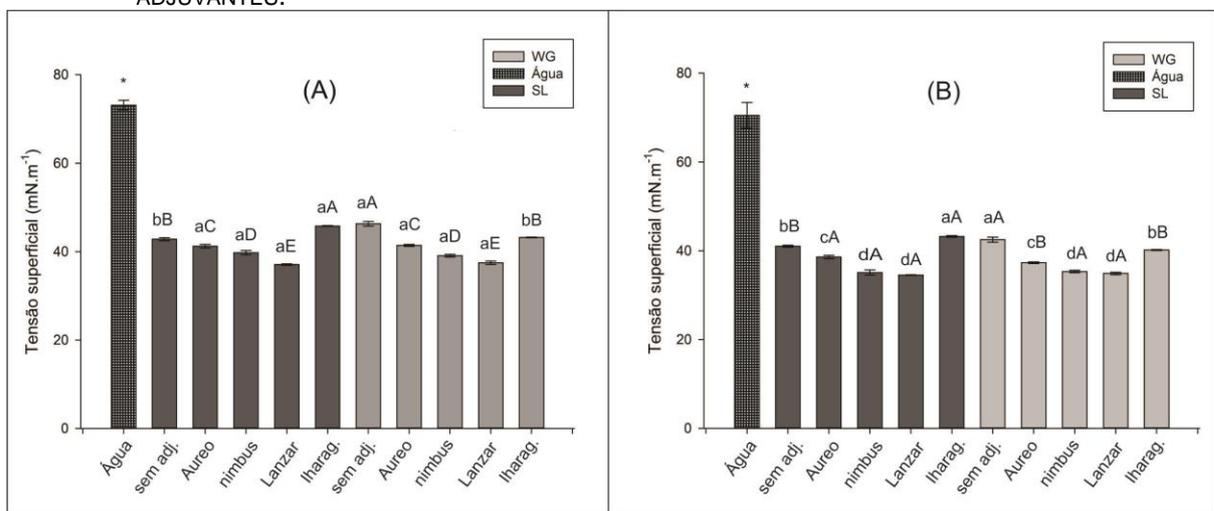
É oportuno relatar que nos tratamentos que continham adjuvantes oleosos como Nimbus® e Aureo® foi observada a retenção de parte do marcador (azul brilhante) na superfície vegetal após o procedimento de lavagem das amostras. Assim, é possível que os efeitos na retenção do marcador tenham, pelo menos em parte, afetado os resultados de depósito obtido com misturas oleosas. Esta observação faz-se útil para outras pesquisas que visem estudar o efeito de adjuvantes sobre o depósito da pulverização, sendo recomendado o emprego de método alternativo para a melhoria

da extração do marcador em superfície, a fim de descartar a possibilidade de erros experimentais.

O efeito dos tratamentos na tensão superficial (TS), aos 5 e 30s após a formação da gota pendente, pode ser visualizada na Figura 9.

Este atributo mede a força de atração entre as moléculas presentes na superfície de um líquido; valores menores geralmente indicam maior potencial de espalhamento do líquido sobre a superfície-alvo (DECARO et al., 2015). A formulação SL, aplicada isoladamente, exibe menor valor de TS em relação à formulação WG, sendo este resultado confirmado para os dois tempos de medição. Isso provavelmente está relacionado com a presença de agentes emulsificantes na formulação SL, os quais contribuem para redução da TS. Quando o adjuvante Iharaguen-s<sup>®</sup> foi adicionado às caldas, foram observados efeitos contrários ao anterior, com menor valor de TS constatado na formulação WG em relação à formulação SL, o que pode ser explicado pela interação desse adjuvante hidrofílico com a água e a formulação WG.

**FIGURA 9** - VALORES (MÉDIAS  $\pm$  EP) DA TENSÃO SUPERFICIAL ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) AOS 5 (A) E 30 SEGUNDOS (B) APÓS A FORMAÇÃO DA GOTA PENDENTE PARA SOLUÇÕES CONTENDO DIFERENTES FORMULAÇÕES E ADJUVANTES.



Letras minúsculas comparam formulações, fixando-se os adjuvantes e letras maiúsculas comparam adjuvantes, fixando-se às formulações. Tratamentos com letras iguais, na comparação de cada fator, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). (\*) Indica semelhança dos tratamentos em relação à testemunha (controle) pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

Em relação aos adjuvantes, observa-se que o uso Iharaguen-s<sup>®</sup> ocasionou aumento da TS quando este adjuvante foi adicionado à formulação SL, o que demonstra o efeito antagônico ao herbicida. Os demais adjuvantes proporcionaram

redução significativa da TS em relação a aplicação das formulações isoladas, com destaque aos adjuvantes Nimbus® e Lanza® que apresentaram os menores valores de TS nos dois tempos de medição. Segundo Nairn et al. (2015) os valores menores de tensão superficial podem ser correlacionados a maior eficácia de controle proporcionada pelos tratamentos herbicidas.

### 3.5.2 Análise dos componentes principais das variáveis da tecnologia de aplicação

Os autovalores da análise dos componentes principais obtidos no estudo da tecnologia de aplicação são apresentados na Tabela 13. Para alcançar o mínimo de 80% da variação acumulada dos dados, fez-se necessária a análise dos quatro primeiros componentes principais (CPs).

No componente principal 1 (CP1), a proporção da variabilidade dos dados foi de 49%. Neste componente as variáveis DMV e G<100 µm apresentaram os maiores autovalores, indicando que essas variáveis sofrem maiores variações em função dos efeitos dos tratamentos. Ainda no CP1, observa-se que as variáveis DMV e G<100 µm apresentam correlação inversa conferida pelos autovalores de sinais opostos (0,58 e -0,61, respectivamente).

O CP2 representou aproximadamente 26% da proporção de variação dos dados. Neste componente a tensão superficial (TS) e o depósito de pulverização apresentaram os maiores autovalores, com 0,77 e -0,51, o que indica haver correlação de ordem inversa, para estas variáveis.

**TABELA 14** - VARIÁVEIS DA CARACTERIZAÇÃO DA TECNOLOGIA DE APLICAÇÃO E RESPECTIVOS AUTOVALORES DOS COMPONENTES PRINCIPAIS, PROPORÇÃO E VARIAÇÃO ACUMULADA.

Variável	CP1	CP2	CP3	CP4
G<100 µm <sup>1</sup>	0,58	-0,16	0,30	-0,60
DMV (µm) <sup>2</sup>	-0,61	0,02	-0,23	-0,17
Coef. <sup>3</sup>	0,46	-0,34	-0,52	0,53
Depósito (µL.g <sup>-1</sup> )	-0,20	-0,51	0,70	0,43
TS (mN.m <sup>-1</sup> ) <sup>4</sup>	0,21	0,77	0,30	0,39
Autovalor	2,468	1,285	1,132	0,069
Proporção (%)	49,40	25,70	22,60	1,40
Var. acumulada(%)	49,40	75,10	97,70	99,10

<sup>1</sup>Porcentagem de gotas menores do que 100 µm; <sup>2</sup>Diâmetro mediano volumétrico (µm); <sup>3</sup>Coefficiente de uniformidade; <sup>4</sup>Depósito da pulverização (µL.g<sup>-1</sup>); <sup>5</sup>Tensão superficial (mN.m<sup>-1</sup>) aos 30 s após a formação da gota pendente.

As variáveis de maior peso no último autovetor devem ser consideradas de menor importância para o estudo (CRUZ, 2006). No caso deste trabalho, o último autovetor foi o componente principal 4 (CP4). Nele as variáveis Depósito e Coef. apresentaram maiores autovalores, o que indica que essas variáveis foram menos influenciadas pelos efeitos dos tratamentos, considerando-se o conjunto de variáveis da caracterização da tecnologia de aplicação.

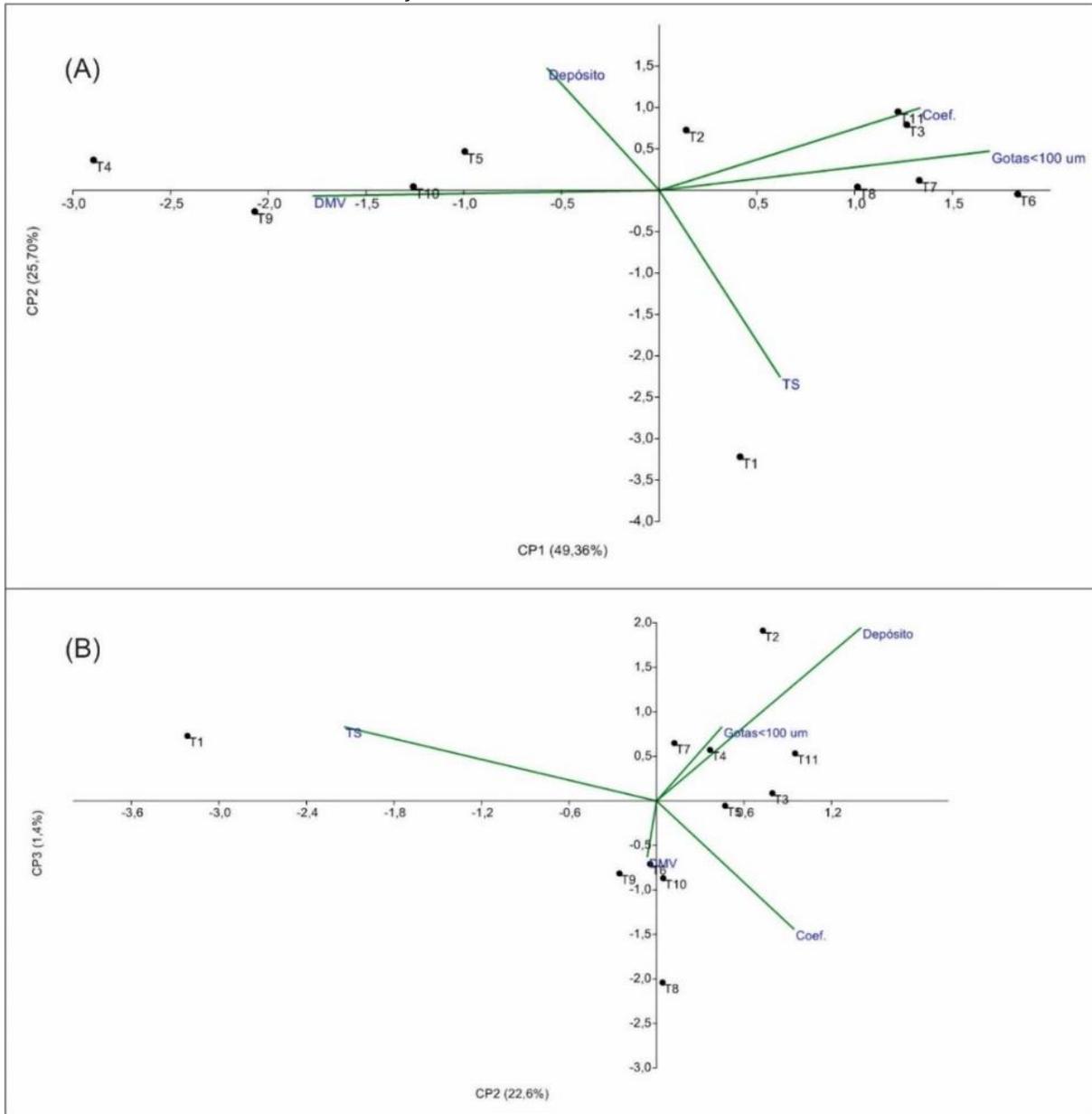
Na Figura 10A é mostrado o gráfico de dispersão entre os tratamentos, no qual nota-se que a influência dos tratamentos sobre as variáveis e a correlação existente entre as mesmas. A distância entre os pontos de dispersão no gráfico representa a diferença dos efeitos proporcionados pelos tratamentos, considerando-se o conjunto de variáveis no estudo da tecnologia de aplicação. A aproximação dos pontos de dispersão das linhas das variáveis, corresponde ao efeito proporcionado pelos tratamentos sobre as mesmas. No primeiro gráfico (Figura 10A) está contido a maioria das informações sobre os efeitos dos tratamentos, com 75,1% da explicação do comportamento dos tratamentos frente às diferentes variáveis, enquanto no segundo gráfico (Figura 10B) está contido apenas 24% das informações dos efeitos, apresentando. Portanto, menor finalidade prática na explicação do comportamento dos tratamentos.

É possível notar que a testemunha (T1) distancia-se nitidamente dos demais tratamentos, o que representa a maior divergência entre os efeitos sobre as variáveis respostas (Figura 10). Observa-se que T1 apresenta maior valor de tensão superficial, conferido pela proximidade à linha de TS. Na mesma figura, observa-se que o tratamento T4 (formulação SL+ Nimbus®) aumentou de forma mais expressiva o DMV, seguidos pelos tratamentos T9, T10 e T5 (Formulação WG + Nimbus®, WG+Lanzar® e SL+Lanzar®). Além disso, observa-se que este conjunto de tratamentos apresentam menor percentagem de gotas menores do que 100 µm ( $G < 100 \mu\text{m}$ ), conferida pelo maior distância à linha desta variável.

Por outro lado, observa-se que os tratamentos T2, T7, T8, T3 e T11, correspondentes à aplicação das formulações de glyphosate sem a adição de adjuvantes à calda, ou quando as formulações foram combinadas aos adjuvantes éster metílico de óleo de soja (Aureo®) e polioxietileno alquilfenol éter (Iharaguens®), apresentaram maiores valores de  $G < 100 \mu\text{m}$ , quando comparados aos tratamentos com adição de adjuvantes a base de óleo mineral (Nimbus®) e alquil ester etoxilado (Lanzar®), evidenciando a maior susceptibilidade à deriva da

aplicação e menor homogeneidade do tamanho das gotas dos tratamentos do primeiro conjunto quando comparados a esse segundo conjunto de tratamentos.

**FIGURA 10** - COMPONENTES PRINCIPAIS, COM RESPECTIVAS COMBINAÇÕES ENTRE: (A) CP1 E CP2; (B) CP1 E CP3, TOMANDO-SE COMO BASE O CONJUNTO VARIÁVEIS PERTENCENTES DE CARACTERIZAÇÃO DA TECNOLOGIA DE APLICAÇÃO



A matriz de correlação revelou a existência de significância apenas entre as variáveis  $G < 100 \mu\text{m}$  e DMV (Tabela 14), apresentando coeficiente de correlação negativo correspondente a 93% ( $r = -0,93$ ), assemelhando-se ao encontrado por Oliveira et al. (2015). No entanto, não foi constatada correlação significativa entre as variáveis de tamanho de gotas e deposição ou entre a tensão superficial e o depósito da pulverização.

**TABELA 15** - VALORES DO COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (R) E RESPECTIVA SIGNIFICÂNCIA (P-VALORES) PARA A COMBINAÇÃO DAS VARIÁVEIS DE TAMANHO DE GOTAS, TENSÃO SUPERFICIAL E DEPÓSITO DA PULVERIZAÇÃO, CONSIDERANDO-SE AS MÉDIAS OBTIDAS PARA O CONJUNTO DE TRATAMENTOS.

Variáveis	G<100 µm	DMV	Coef.	Dep.	TS
-----P-valor-----					
G<100 µm <sup>1</sup>	-	0,00	0,09	0,89	0,49
DMV <sup>2</sup>	-0,93**	-	0,08	0,77	0,27
Coef. <sup>3</sup>	0,53	-0,56	-	0,23	0,45
Depósito	0,05	0,10	-0,40	-	0,28
TS <sup>5</sup>	0,24	-0,37	-0,26	-0,35	-

\*\*Correlação significativa a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); <sup>1</sup>Porcentagem de gotas menores do que 100 µm; <sup>2</sup>Diâmetro mediano volumétrico (µm); <sup>3</sup>Coefficiente de uniformidade; <sup>4</sup>Depósito da pulverização ( $\mu\text{L.g}^{-1}$ ); <sup>5</sup>Tensão superficial ( $\text{mN.m}^{-1}$ ) aos 30 s após a formação da gota pendente.

### 3.5.3 Interação Depósito-Alvo

Os valores de F da análise de variância dos dados de ângulo de contato (AC), em superfície artificial (parafilme) e natural (*D. insularis*), aos 5 e 30s após o depósito das gotas sobre as superfícies estão mostrados na Tabela 15. Observa-se que as formulações de glyphosate apresentam diferenças significativas apenas para a medida do AC em parafilme aos 30s após a deposição da gota na superfície. Por outro lado, foram constatadas diferenças significativas entre os adjuvantes para todas as medidas de AC em análise. O maiores valores de F, obtidos para o fator adjuvante, revelam a maior magnitude dos efeitos proporcionados por este fator quando comparados aos efeitos proporcionados pelas formulações. A interação significativa entre os fatores foi identificada apenas em superfície artificial. Em todas as medidas de ângulo de contato a interação formulação x adjuvante apresentou diferença significativa quando comparada à testemunha.

Em geral, os maiores valores de AC encontrados para o tratamento testemunha (água) revelaram que a superfície adaxial da *D. insularis* possui menor polaridade quando comparada à superfície do parafilme (Figura 11). O AC identificado no tratamento testemunha em *D. insularis* foi de aproximadamente 150°, sendo este valor superior ao encontrado em literatura para outras espécies de plantas daninhas de importância agrícola, como *Euphorbia heterophylla*, *Ipomoea grandifolia* e *Brachiaria plantaginea* (IOST et al., 2010), revelando acentuada hidrorrepelência da *D. insularis* em relação às superfícies das demais espécies vegetais. Ainda, em relação às testemunhas, todos os tratamentos que continham glyphosate apresentaram menor ângulo de contato em ambas as superfícies, o que confirma o efeito benéficos das formulações e/ou adjuvantes na TS.

**TABELA 16** - VALORES DE F DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O ÂNGULO DE CONTATO (°) EM SUPERFÍCIE ARTIFICIAL (PARAFILME) E NATURAL (SUPERFÍCIE ADAXIAL DE *D. INSULARIS*) AOS 5 E 30S APÓS A DEPOSIÇÃO DA GOTTA NAS SUPERFÍCIES.

Fonte de Var.	Parafilme-5 s	Parafilme-30 s	Digitaria-5s	Digitaria-30 s
Formulação (F)	0,49 <sup>NS</sup>	8,24 <sup>**</sup>	0,26 <sup>NS</sup>	0,03 <sup>NS</sup>
Adjuvante (A)	45,46 <sup>**</sup>	88,10 <sup>**</sup>	27,43 <sup>**</sup>	88,53 <sup>**</sup>
F <sub>FxA</sub> <sup>1</sup>	12,67 <sup>**</sup>	10,89 <sup>**</sup>	1,87 <sup>NS</sup>	1,86 <sup>NS</sup>
F <sub>fat.xTest</sub> <sup>2</sup>	884.98 <sup>**</sup>	911.08 <sup>**</sup>	204.65 <sup>**</sup>	291.15 <sup>**</sup>
CV(%) <sup>3</sup>	2,22	2,78	2,41	2,79

<sup>\*\*</sup>Significativo a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); <sup>1</sup>Interação entre os fatores formulação e adjuvante; <sup>2</sup>Comparação do fatorial com a Testemunha; <sup>3</sup>Coefficiente de variação (%).

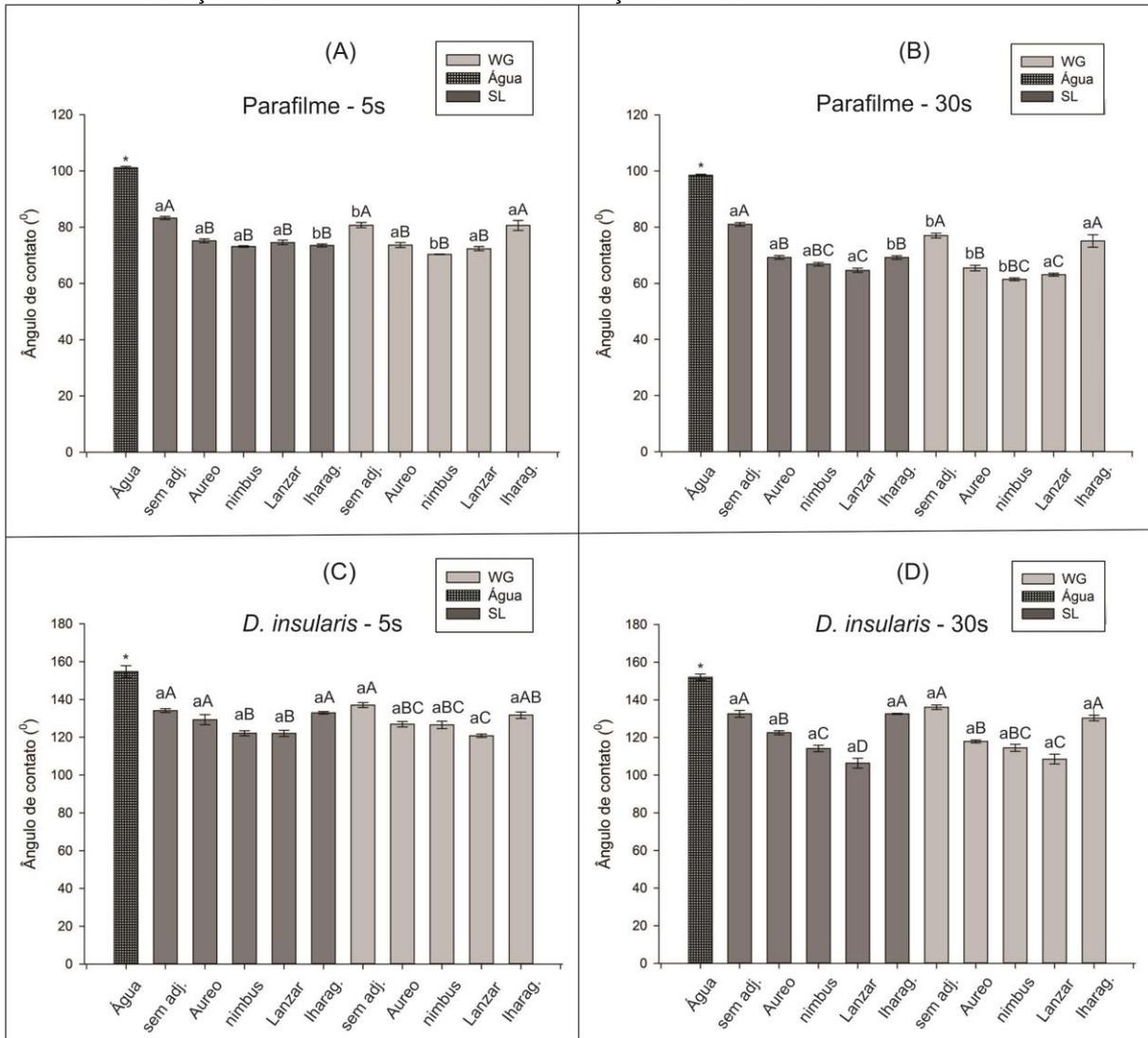
Nos tratamentos não associados a adjuvante houve menor ângulo de contato com a formulação WG em relação à formulação SL, sendo este comportamento identificado apenas na superfície do parafilme (Figura 11A e 11B). Isso pode ser explicado pela maior polaridade da formulação WG diluída em água sobre uma superfície de levemente hidrofóbica. Quando comparadas as formulações sem adição de adjuvantes com a adição do adjuvante Iharaguen-s<sup>®</sup>, observa-se que a redução do ângulo de contato quando o adjuvante foi associado a formulação SL, enquanto que, na formulação WG, não foi encontrada diferença significativa, sobre a superfície parafilme.

Na superfície de menor hidrofobicidade (Parafilme) a ação do adjuvante Iharaguen-s<sup>®</sup> foi maior sobre a formulação oleosa em relação à WG, quando avaliou-se o ângulo de contato das caldas herbicidas.

Em geral, a maior parte dos adjuvantes promoveu efeitos positivos na redução do ângulo de contato quando associados às diferentes formulações de glyphosate, com destaque aos adjuvantes Lanza<sup>®</sup> e Nimbus<sup>®</sup>, que apresentaram os menores ângulos de contato em superfície natural (Figura 11C e 11D).

Por outro lado, não foi observado decréscimo do ângulo de contato, em superfície natural, nas associações ao adjuvante Iharaguen-s<sup>®</sup>. Assim como o relatado por Nairn et al. (2015) é provável que os tratamentos que possuam maior polaridade, como o caso das combinações das formulações aos adjuvantes polioxietileno alquilfenol éter, apresentem menor combinação a superfícies hidrofóbicas, como é o caso da *D. insularis*, resultando em maiores ângulos de contato e menor espalhamento das gotas sobre a superfície.

**FIGURA 11 – VALORES**  
(MÉDIAS ± EP) DO ÂNGULO DE CONTATO ENTRE A GOTA E AS SUPERFÍCIES (PARAFILME E *D. INSULARIS*) DE SOLUÇÕES CONTENDO DIFERENTES FORMULAÇÕES E ADJUVANTES.



Letras minúsculas comparam as formulações, nos diferentes adjuvantes e letras maiúsculas comparam os adjuvantes, nas diferentes formulações. Tratamentos com letras iguais, na comparação de cada fator, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). (\*) Indica semelhança dos tratamentos em relação à testemunha (controle) pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

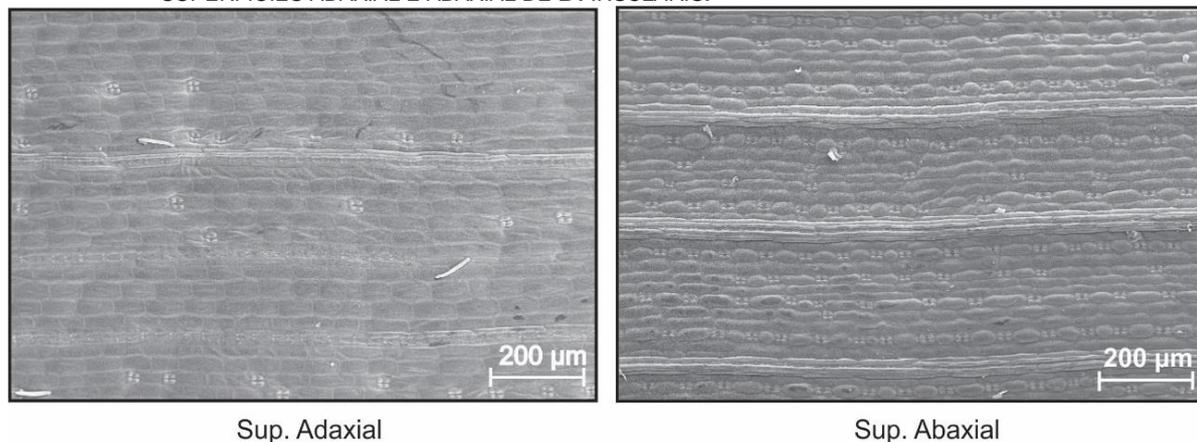
### 3.5.3.1 Fitotoxicidade

#### Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens das superfícies adaxial e abaxial de folhas de *D. insularis*, em microestrutura encontram-se presentes na Figura 12. É possível notar a menor quantidade de estômatos presentes na superfície adaxial, onde o índice estomático mensurado foi de aproximadamente 22 estômatos. $\text{mm}^{-2}$ , enquanto que na superfície abaxial, o índice estomático foi de 148 estômatos. $\text{mm}^{-2}$ , correspondendo a uma relação de 6,72 vezes. Ressalta-se que a pulverização dos produtos fitossanitários tende a acumular-se na superfície adaxial foliar, onde a quantidade de estômatos na

*D. insularis* é muito menor. Assim, é provável que os estômatos apresentem pouca importância na penetração dos produtos fitossanitários através da cutícula foliar de *D. insularis*.

**FIGURA 12** - IMAGENS EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV) DA MICROESTRUTURA DAS SUPERFÍCIES ADAXIAL E ABAXIAL DE *D. INSULARIS*.



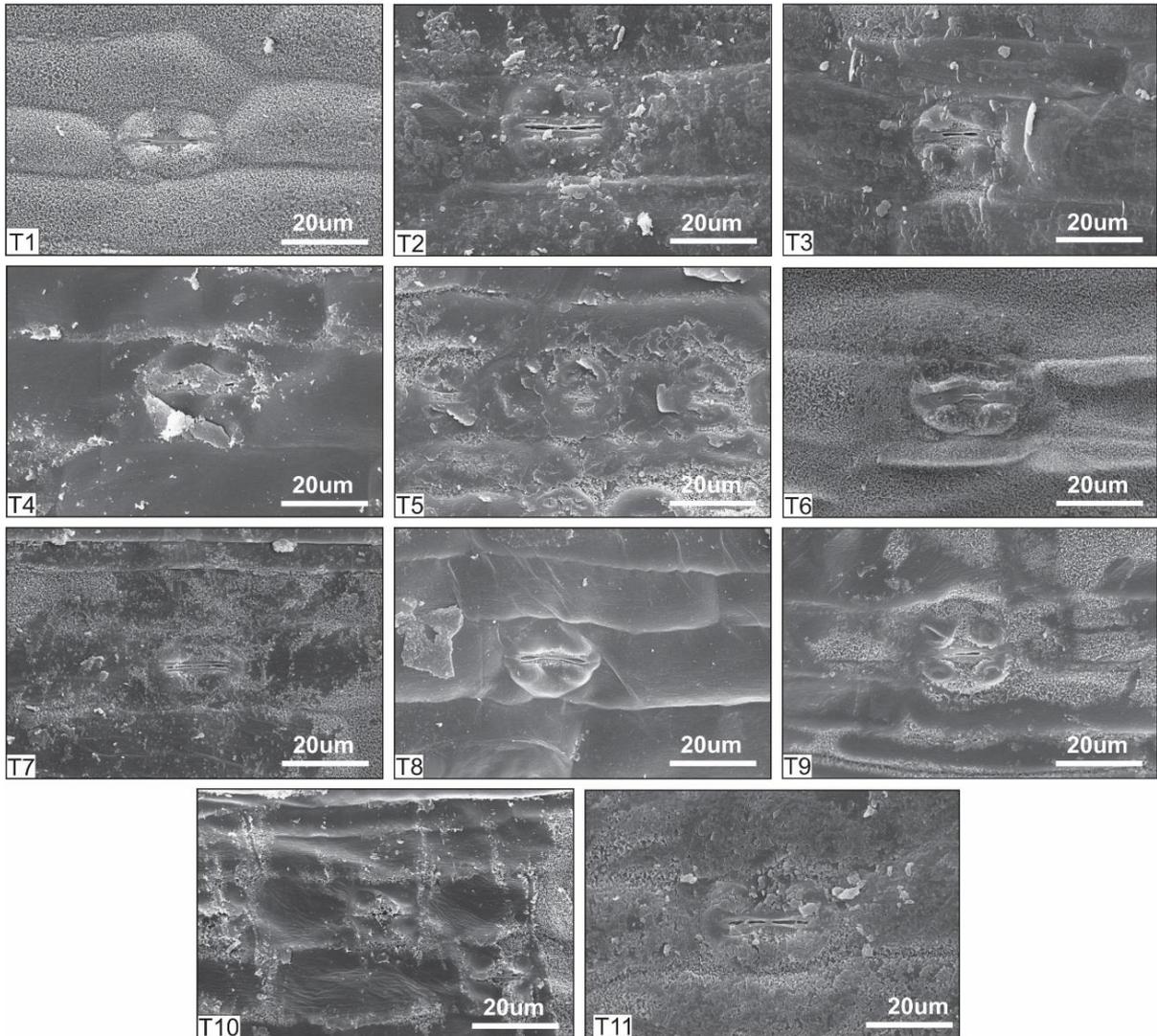
As imagens da microestrutura da superfície adaxial de folhas de *D. insularis*, em microscopia eletrônica de varredura (MEV) 4 dias após a aplicação dos tratamentos (4 DAA) são mostradas na Figura 13. Observa-se no Tratamento 1 (testemunha) que a superfície das folhas de *D. insularis* apresenta epicutícula de aspecto esponjoso que recobre toda a superfície foliar, mesmo nas regiões que circundam os estômatos, o que reforça a informação sobre a importância dos efeitos proporcionados pelas formulações e adjuvantes sobre esta estrutura para a garantia da eficácia da penetração para melhoria da ação dos herbicidas.

Os efeitos constatados a partir da aplicação das formulações de glyphosate, revelam que todos os tratamentos apresentaram sintomas de fitointoxicação foliar, no entanto, os sintomas mais pronunciados foram observados nos tratamentos com a presença dos adjuvantes à base de óleo vegetal metilado (Aureo®), óleo mineral (Nimbus®) e alquil ester etoxilado (Lanzar®), associados a ambas formulações, onde pôde-se notar a solubilização da epicutícula foliar (Figura 13).

Nos tratamentos com a adição de adjuvantes à base de polioxietileno alquilfenol éter (Iharaguen-s®), em ambas as formulções do hericida (T6 e T11), os efeitos de fitotoxicidade foram menos expressivos, mesmo quando comparados aos tratamentos com o uso das formulações sem a associação aos adjuvantes. Ressalta-se que tanto o glyphosate como o polioxietileno são produtos hidrofílicos,

portanto com ação menor sobre estruturas hidrofóbicas. Assim, esta característica pode ter sido responsável pela atenuação dos efeitos causados na cutícula foliar.

**FIGURA 13** - SINTOMAS DE FITOTOXICIDADE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) NA SUPERFÍCIE ADAXIAL DE FOLHAS DE *D. INSULARIS* 4 DIAS APÓS A APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS. TRATAMENTOS: T1 – TESTEMUNHA (ÁGUA); T2 - FORMULAÇÃO SL (SL); T3 – SL+AUREO®; T4 – SL+NIMBUS®; T5 – SL + LANZAR®; T6 – SL+IHARAGUEN-S®; T7 – FORMULAÇÃO WG (WG); T8 - WG+AUREO®; T9 - WG+LANZAR®; T 10 - WG+NIMBUS®; T11 - WG+IHARAGUEN-S®.



### Microscopia de Luz (ML)

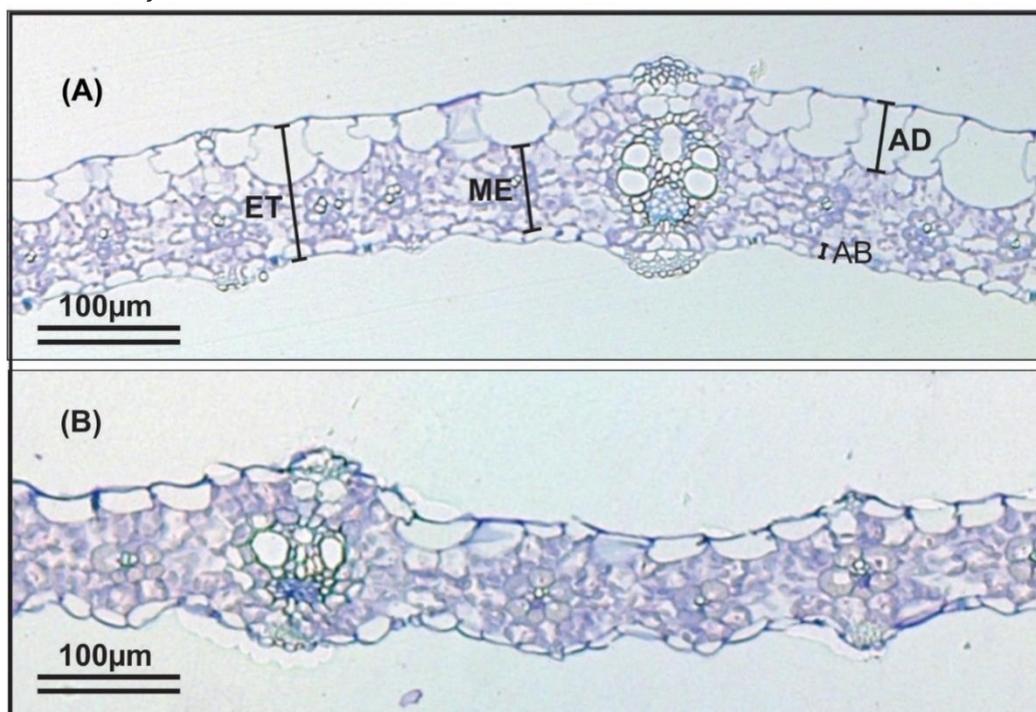
Na Figura 14 são mostrados os cortes transversais em microscopia de luz (ML), de folhas de *D. insularis* sem aplicação de glyphosate (Figura 14A) e aos 4 dias após a aplicação do herbicida (Figura 14B), junto aos detalhes de como foram feitas as medições da espessura dos tecidos foliares.

Assim, observa-se que a planta tratada com o herbicida tende a apresentar

tecidos com aspecto distinto a uma folha não tratada, notavelmente pela alteração da espessura dos tecidos foliares, provavelmente devido o bloqueio na produção de aminoácidos essenciais ao desenvolvimento da planta, podendo estas medidas serem utilizadas na comparação entre os efeitos dos tratamentos.

Os valores de F da análise de variância para a comparação dos tratamentos sobre os efeitos nos tecidos foliares de *D. insularis* aos quatro dias após a aplicação (4 DAA) encontram-se presentes na Tabela 16.

**FIGURA 14** - IMAGEM EM MICROSCOPIA DE LUZ (ML) DE CORTES TRANSVERSAIS DE FOLHAS DE *D. INSULARIS*, ILUSTRANDO O ASPECTO DOS TECIDOS FOLIARES, JUNTAMENTE COM AS MEDIDAS REALIZADAS DA ESPESSURA TOTAL (ET), MESOFILO (ME), EPIDERME ADAXIAL (AD) E ABAXIAL (AB), SEM A APLICAÇÃO DO GLYPHOSATE (A) E COM O TRATAMENTO HERBICIDA (B) AOS 4 DIAS APÓS A APLICAÇÃO.



A única diferença significativa encontrada entre os fatores foi observada para a comparação da medida do mesofilo foliar (ME). Por outro lado, a comparação da testemunha (água) com o fatorial, revelou haver diferenças significativas na espessura total (ET) e espessura da epiderme adaxial (ADA).

A comparação das médias obtidas para os diferentes tratamentos, revela que a epiderme adaxial e abaxial foram os tecidos que sofreram maior impacto na espessura foliar, nos quais, todos os tratamentos que continham o herbicida glyphosate, foram significativamente diferentes em relação à testemunha (Figura 15).

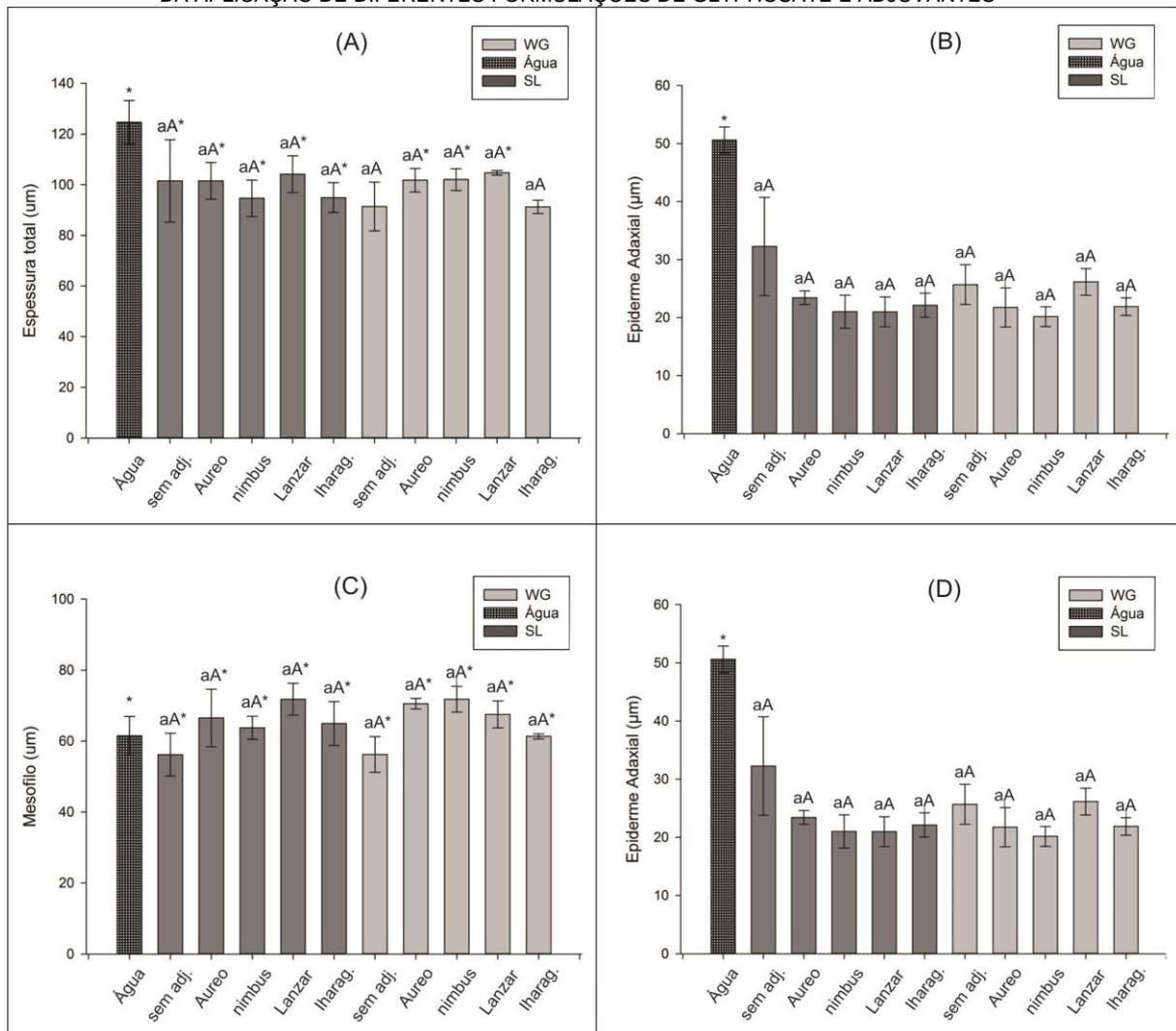
**TABELA 17** - VALORES DE F DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A ESPESSURA TOTAL- ET ( $\mu\text{m}$ ), ESPESSURA DA EPIDERMIS ADAXIAL - ADA ( $\mu\text{m}$ ), MESOFILO - ME ( $\mu\text{m}$ ) E EPIDERMIS ABAXIAL - ABA ( $\mu\text{m}$ ) DE FOLHAS DA *D. INSULARIS* AOS 4 DIAS APÓS A APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS (4 DAA).

Causa de Var.	ET	ADA	ME	ABA
Formulação (F)	0,05 <sup>NS</sup>	0,14 <sup>NS</sup>	0,08 <sup>NS</sup>	1,41 <sup>NS</sup>
Adjuvante (A)	0,66 <sup>NS</sup>	1,65 <sup>NS</sup>	2,72 <sup>*</sup>	0,54 <sup>NS</sup>
F <sub>FxA</sub> <sup>1</sup>	0,35 <sup>NS</sup>	0,70 <sup>NS</sup>	0,60 <sup>NS</sup>	0,63 <sup>NS</sup>
F <sub>fat.xTest</sub> <sup>2</sup>	9.99 <sup>**</sup>	55.87 <sup>**</sup>	0.49 <sup>NS</sup>	3.88 <sup>NS</sup>
CV(%) <sup>3</sup>	15,60	30,15	14,62	23,36

\*\*Significativo a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); \*Significativo a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ );

<sup>1</sup>Interação entre os fatores formulação e adjuvante; <sup>2</sup>Fatorial vs Testemunha; <sup>3</sup>Coefficiente de variação (%).

**FIGURA 15** - VALORES (MÉDIAS  $\pm$  EP) DA ESPESSURA DOS TECIDOS FOLIARES DE *D. INSULARIS* ( $\mu\text{m}$ ): (A) ESPESSURA TOTAL; (B) EPIDERMIS ADAXIAL; (C) MESOFILO E (D) EPIDERMIS ABAXIAL A PARTIR DA APLICAÇÃO DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DE GLYPHOSATE E ADJUVANTES



Letras minúsculas comparam as formulações, ficando-se o adjuvante e letras maiúsculas comparam os adjuvantes, fixando-se a formulação. Tratamentos com letras iguais, na comparação de cada fator, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). (\*) Indica semelhança dos tratamentos em relação à testemunha (controle) pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

A comparação das médias obtidas para os diferentes tratamentos revela que a epiderme adaxial e abaxial foram os tecidos que sofreram maior impacto na espessura foliar, onde todos os tratamentos que continham o herbicida glyphosate, foram significativamente da testemunha.

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos que continham o herbicida glyphosate. Assim como relatado por Souza et al. (2007), supeita-se que a alta variação do depósito da pulverização, que normalmente ocorre em situações de aplicação de produtos fitossanitários, bem como as variações naturais na arquitetura das plantas e na espessura dos tecidos foliares tenham conferido erros experimentais que tornam a técnica de análise da comparação entre os efeitos de fitotoxicidade, pela medição espessura dos tecidos foliares, de baixa sensibilidade em identificar diferenças entre os sintomas causados pelo tratamentos herbicidas.

### 3.5.3.2 Absorção de glyphosate, determinação do ácido chiquímico e controle de *D. insularis*

De acordo com os valores de F da análise de variância apresentados na Tabela 17, pode-se notar que as formulações não apresentaram diferenças significativas para o conjunto de variáveis consideradas. Por outro lado, os adjuvantes apresentaram diferença significativa ( $p < 0,01$ ) em relação às variáveis de absorção, ácido chiquímico e controle. Além disso, foi notada diferença significativa para a interação dos fatores, na variável controle, e diferenças significativas na comparação entre interação formulação x adjuvante e a testemunha para todas as variáveis em análise.

**TABELA 18** - VALORES DE F DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA AS VARIÁVEIS: ABSORÇÃO DO GLYPHOSATE (ABS.) E ÁCIDO CHIQUÍMICO ACUMULADO (Ác.) 24 HORAS APÓS A APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS, CONTROLE VISUAL (C) E MASSA SECA REMANESCENTE DE *D. INSULARIS* (C) AOS 21 DIAS APÓS A APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS.

Causa de Var.	Abs.	Ác.	C	MS
Formulação (F)	2,75 <sup>NS</sup>	0,06 <sup>NS</sup>	1,20 <sup>NS</sup>	0,76 <sup>NS</sup>
Adjuvante (A)	11,59 <sup>**</sup>	7,79 <sup>**</sup>	3,32 <sup>*</sup>	0,54 <sup>NS</sup>
F <sub>FxA</sub> <sup>1</sup>	1,85 <sup>NS</sup>	0,81 <sup>NS</sup>	4,74 <sup>**</sup>	0,36 <sup>NS</sup>
F <sub>fat.xTest</sub> <sup>2</sup>	54,57 <sup>**</sup>	141,76 <sup>**</sup>	29402,09 <sup>**</sup>	155,71 <sup>**</sup>
CV(%) <sup>3</sup>	30,27	17,15	1,43	61,64

<sup>\*\*</sup>Significativo a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); <sup>\*\*</sup>Significativo a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )

<sup>1</sup>Interação entre os fatores formulação e adjuvante; <sup>2</sup>Comparação entre o fatorial e a testemunha;

<sup>3</sup>Coefficiente de variação (%).

Observa-se que todos os tratamentos que continham o herbicida glyphosate foram significativamente diferentes da testemunha, considerando-se o conjunto de variáveis em análise (Figura 16).

Quando comparadas as formulações para os tratamentos que continham o adjuvante Aureo<sup>®</sup>, verifica-se maior absorção do herbicida na formulação SL, comparativamente à formulação WG. Essa diferença correspondeu a 44,7% a mais na absorção do herbicida. Constatou-se também valor de controle ligeiramente menor entre a combinação do Iharaguen-s<sup>®</sup> à formulação SL em relação à formulação WG (Figura 16C). No entanto, ambos os tratamentos apresentaram controle acima de 80%, sendo considerado satisfatório.

Os adjuvantes Aureo<sup>®</sup>, Nimbus<sup>®</sup> e Lanzar<sup>®</sup> proporcionaram incrementos significativos da absorção do glyphosate quando estes adjuvantes foram associados à formulação SL em comparação ao tratamento sem associação de adjuvantes à calda. Essas diferenças corresponderam a 129, 157 e 171% da absorção do herbicida (Figura 16A).

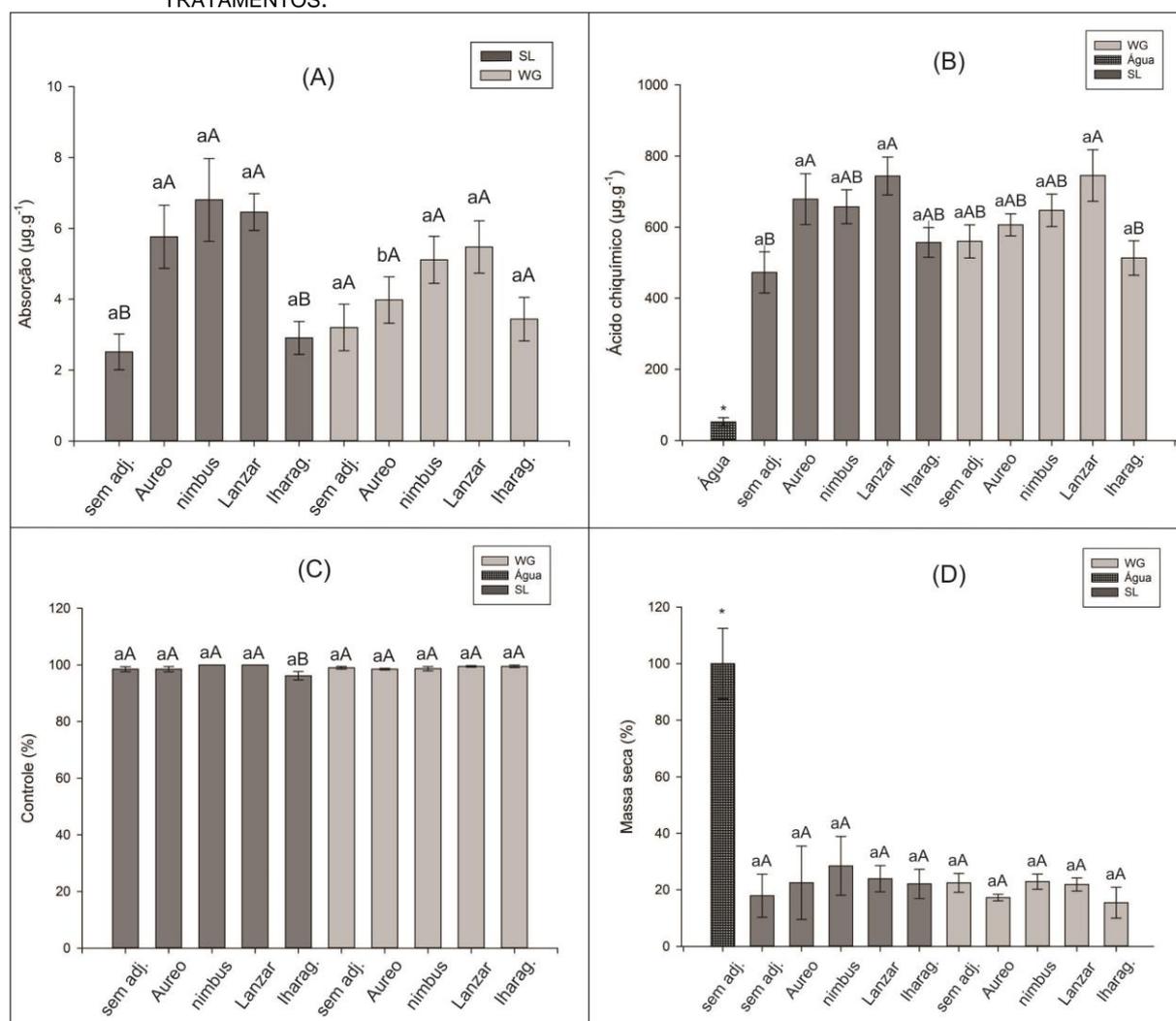
Assim, é provável que o controle da *D. insularis* atinja o esperado com dose menor do herbicida quando a formulação SL é combinada a esses adjuvantes. Por outro lado, não houve diferença significativa entre os adjuvantes para a absorção da formulação WG, sendo notado apenas incremento numérico na absorção do herbicida (Figura 16A).

A comparação entre os adjuvantes no acúmulo do ácido chiquímico (Figura 16B) na aplicação da formulação SL revelou acúmulo maior do composto nos tratamentos com a adição dos adjuvantes Aureo<sup>®</sup> e Lanzar<sup>®</sup> em relação à aplicação da formulação isolada. As diferenças corresponderam a 44 e 57% a mais do ácido chiquímico acumulado, com a adição dos adjuvantes Aureo<sup>®</sup> e Lanzar<sup>®</sup>, respectivamente. Já na formulação WG, a única diferença significativa foi identificada entre o Lanzar<sup>®</sup> e o Iharaguen-s<sup>®</sup>, com o primeiro adjuvante apresentando maior acúmulo de ácido chiquímico em relação ao segundo.

Assim, é possível que o incremento na absorção de glyphosate e acúmulo de ácido chiquímico, identificado para os adjuvantes Aureo<sup>®</sup>, Nimbus<sup>®</sup> e Lanzar<sup>®</sup> possa contribuir para a otimização do controle da *D. insularis*. Além disso, esses efeitos poderiam ser favoráveis ao controle da planta daninha sob condição de estresse, ou sobre populações resistentes ao herbicida, cabendo, assim, maiores investigações a respeito desses temas.

Para as variáveis controle (C) e matéria seca remanescente (MS) não foram identificadas diferenças significativas entre os fatores, confirmando que independente do adjuvante utilizado a aplicação da dose comercial apresenta controle satisfatório da *D. insularis* (Figura 16C e 16D).

**FIGURA 16** - VALORES (MÉDIAS  $\pm$  EP) PARA AS VARIÁVEIS: (A) ABSORÇÃO DO GLYPHOSATE; (B) ÁCIDO CHIQUÍMICO ACUMULADO, 24 HORAS APÓS A APLICAÇÃO DO HERBICIDA; (C) CONTROLE VISUAL E (D) MASSA SECA REMANESCENTE DE *D. INSULARIS*, AOS 21 DIAS APÓS A APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS.



Letras minúsculas comparam as formulações nos diferentes adjuvantes e letras maiúsculas comparam os adjuvantes nas diferentes formulações. Tratamentos com letras iguais, na comparação de cada fator, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). (\*) Indica semelhança dos tratamentos em relação à testemunha (controle) pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

### 3.5.3.3 Componentes principais dos ensaios da interação depósito-alvo

Os autovalores obtidos pela análise dos componentes principais dos ensaios da interação depósito-alvo são apresentados na Tabela 18. Observa-se que os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2) foram suficientes para explicar 90%

da variabilidade acumulada dos dados, facilitando a interpretação dos efeitos dos tratamentos nas diferentes variáveis.

**TABELA 19** - AUTOVALORES DAS VARIÁVEIS DA INTERAÇÃO DEPÓSITO-ALVO NOS COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1, CP2 E CP3), COM RESPECTIVO AUTOVALOR, PROPORÇÃO DO COMPONENTE (%) E VARIACÃO ACUMULADA (%).

Variáveis	CP1	CP2	CP3
AC (30 s) <sup>1</sup>	0,321	0,408	-0,010
ET <sup>2</sup>	0,319	-0,413	-0,059
ADA <sup>3</sup>	0,390	0,006	0,188
ME <sup>4</sup>	-0,149	-0,610	-0,620
ABA <sup>5</sup>	0,255	-0,439	0,618
Abs. <sup>6</sup>	-0,337	-0,299	0,287
Ác. <sup>7</sup>	-0,375	-0,190	0,261
C <sup>8</sup>	-0,386	0,114	0,188
MS <sup>9</sup>	0,373	-0,163	-0,090
Autovalor	6,115	2,021	0,446
Proporção (%)	67,9	22,5	5
Variacão acumulada (%)	67,9	90,4	95,4

<sup>1</sup>Ângulo de contato ( $^{\circ}$ ) aos 30 s após o depósito da gota, <sup>2</sup>Espessura total ( $\mu\text{m}$ ), <sup>3</sup>Epiderme Adaxial ( $\mu\text{m}$ ), <sup>4</sup>Mesofilo ( $\mu\text{m}$ ), <sup>5</sup>Epiderme abaxial ( $\mu\text{m}$ ), <sup>6</sup>Absorção ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), <sup>7</sup>Ácido chiquímico ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), <sup>8</sup>Controle visual (%), <sup>9</sup>Matéria seca remanescente(%).

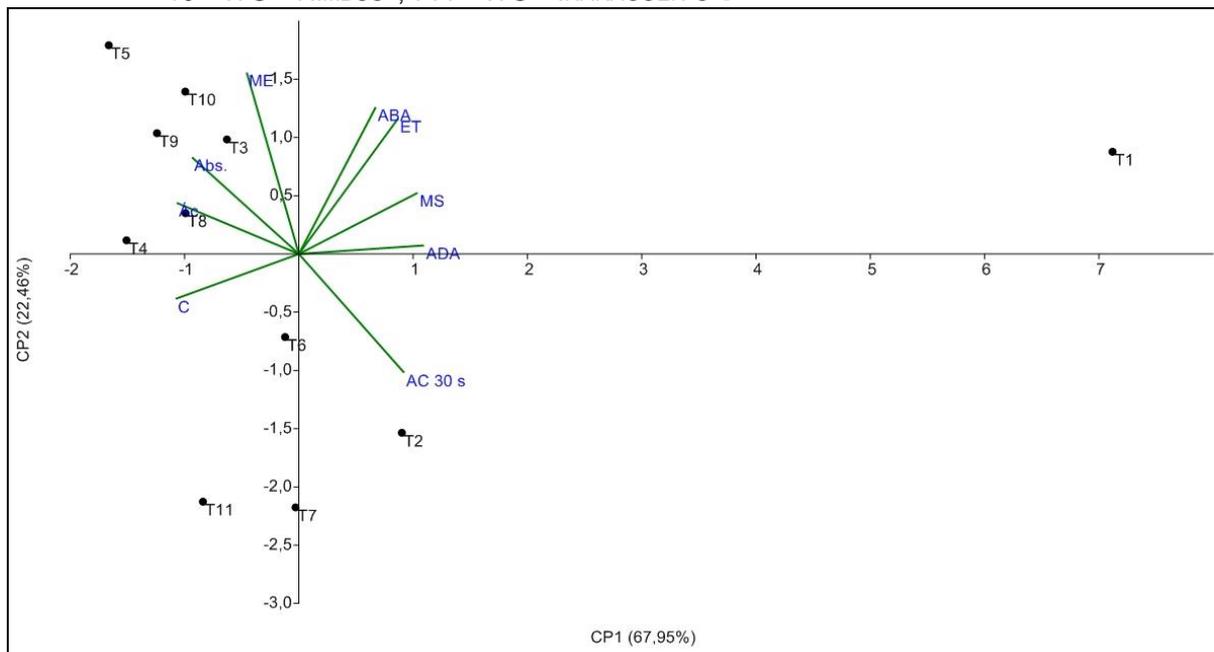
Os maiores autovalores identificados no último autovetor (CP3) para as variáveis mesófilo (ME) e epiderme abaxial (ABA), revelam que essas duas variáveis foram menos influenciadas pela ação dos tratamentos, considerando-se o conjunto de variáveis da interação depósito-alvo.

O gráfico de dispersão dos tratamentos e a relação entre as variáveis consideradas na interação depósito-alvo é mostrado na Figura 17. É possível notar a relação de proximidade entre os seguintes tratamentos: T5, T4, T9, T10, T3 e T8 que continham a adição dos adjuvantes Lanza<sup>®</sup>, Nimbus<sup>®</sup> e Aureo<sup>®</sup>, em ambas as formulações de glyphosate. Esses tratamentos apresentaram maior proximidade às linhas de absorção (Abs.), ácido chiquímico (Ác.), revelando os maiores valores encontrados para essas variáveis. Esse conjunto de tratamentos apresentou maior afastamento da linha que representa o ângulo de contato (AC), indicando menores valores para esta variável e, portanto, maior espalhamento do líquido sobre a superfície da *D. insularis*. Em síntese, este conjunto de tratamentos apresentou melhor performance sobre as variáveis da interação depósito-alvo.

Por outro lado, os tratamentos T2, T6, T7e T11, com a aplicação das

formulações de glyphosate isoladas ou em mistura ao adjuvante Iharaguen-s<sup>®</sup>, apresentaram maior proximidade à linha que representa o ângulo de contato e maiores distâncias às linhas de absorção (Abs.) e ácido chiquímico acumulado (Ác.), o que indica os menores valores encontrados para essas variáveis. Observa-se ainda que as variáveis que representam o controle (C), a matéria seca (MS) e as variáveis correspondentes às espessuras dos tecidos foliares (ET, ABA, ADA) não foram influenciadas pelos fatores formulação e adjuvante. Assim, pode-se inferir que esse conjunto de tratamentos apresenta menor efeito sobre as variáveis da interação depósito-alvo. Nota-se ainda, que o tratamento testemunha apresentou os maiores afastamentos em relação aos demais tratamentos, e proximidade às linhas de ABA, ET, MS e ADA, indicando maiores valores para estas variáveis.

**FIGURA 17** - COMPONENTES PRINCIPAIS, CP1 E CP2, DO CONJUNTO DE VARIÁVEIS PERTENCENTES AOS ENSAIOS DE INTERAÇÃO DO DEPÓSITO-ALVO. TRATAMENTOS: T1 – TESTEMUNHA (ÁGUA); T2 - FORMULAÇÃO SL (SL); T3 – SL + AUREO<sup>®</sup>; T4 – SL + NIMBUS<sup>®</sup>; T5 – SL + LANZAR<sup>®</sup>; T6 – SL + IHARAGUEN-S<sup>®</sup>; T7 – FORMULAÇÃO WG (WG); T8 – WG + AUREO<sup>®</sup>; T9 – WG + LANZAR<sup>®</sup>; T 10 – WG + NIMBUS<sup>®</sup>; T11 – WG + IHARAGUEN-S<sup>®</sup>.



Conforme apresentado na Tabela 19, boa parte das variáveis envolvidas no estudo da interação depósito-alvo apresenta correlação significativa. Valores de correlação acima de 90% foram identificados para a associação entre as variáveis: Ác. e Abs. (92%); ADA e C (-92%); C e MS (99%). As variáveis ME e ABA apresentaram o menor número de significância nos testes de correlação, o que reforça a informação sobre a menor importância das mesmas para o presente

estudo.

As correlações significativas confirmam a hipótese da relação entre a redução do ângulo de contato sobre a superfície e da espessura foliar no aumento do potencial de controle de *D. insularis*, conferido pelo maior acúmulo do ácido chiquímico.

**TABELA 20** - VALORES DO COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (R) E RESPECTIVA SIGNIFICÂNCIA (P-VALORES) PARA A COMBINAÇÃO DAS VARIÁVEIS DE TAMANHO DE GOTAS, TENSÃO SUPERFICIAL E DEPÓSITO DA PULVERIZAÇÃO, CONSIDERANDO-SE O CONJUNTO DE TRATAMENTOS.

Var.	AC	ET	ADA	ME	ABA	Abs	Ác.	C.	MS
----- P-Valores -----									
AC <sup>1</sup>	-	0,38	0,01	0,01	0,56	0,00	0,00	0,02	0,05
ET. <sup>2</sup>	0,29	-	0	0,63	0,00	0,20	0,05	0,00	0,00
ADA <sup>3</sup>	0,74**	0,80**	-	0,18	0,04	0,01	0,00	0,00	0,00
ME <sup>4</sup>	-0,71*	0,16	-0,44	-	0,69	0,07	0,12	0,57	0,64
ABA <sup>5</sup>	0,20	0,81**	0,63*	0,14	-	0,58	0,3	0,04	0,02
Abs <sup>6</sup>	-0,92**	-0,42	-0,77**	0,41	-0,45	-	0,00	0,02	0,05
Ác. <sup>7</sup>	-0,90**	-0,61*	-0,89**	0,5	-0,35	0,90**	-	0,00	0,00
C <sup>8</sup>	-0,68*	-0,84**	-0,92**	0,19	-0,63*	0,70*	0,89**	-	0,00
MS <sup>9</sup>	0,61*	0,84**	0,89**	-0,16	0,67*	-0,60	-0,84**	-0,99**	-

\*Correlação significativa a 5% de probabilidade ( $p < 0,01$ ) \*\*Correlação significativa a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ). <sup>1</sup>Ângulo de contato ( $^{\circ}$ ) aos 30 s após o depósito da gota; <sup>2</sup>Espessura total ( $\mu\text{m}$ ), <sup>3</sup>Epiderme Adaxial ( $\mu\text{m}$ ), <sup>4</sup>Mesofilo ( $\mu\text{m}$ ), <sup>5</sup>Epiderme abaxial ( $\mu\text{m}$ ); <sup>6</sup>Absorção ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), <sup>7</sup>Ácido chiquímico ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), <sup>8</sup>Controle visual (%), <sup>9</sup>Matéria seca remanescente(%).

### 3.6 CONCLUSÃO

Os adjuvantes apresentam maiores efeitos do que as formulações sobre as variáveis da tecnologia de aplicação e fitointoxicação de *D. insularis*, promovendo redução do potencial risco de deriva, aumento do espalhamento da calda sobre a superfície-alvo e incremento da absorção do herbicida nos tecidos foliares.

A associação dos adjuvantes óleo mineral e alquil ester etoxilado ao glyphosate potencializa o controle de *D. insularis*. Assim, provavelmente, diferenças no controle da planta daninha poderiam ser manifestadas em plantas sob condições de estresse e/ou situações ambientais críticas à pulverização.

### REFERÊNCIAS

AMRHEIN, N. et al. The Site of the Inhibition of the Shikimate Pathway by Glyphosate: II. Interference of glyphosate with chorismate formation in vivo and in vitro. **Plant Physiology**, v. 66, n. 5, p.830-834, 1 nov. 1980.

ARNE BRATHUHN, 26., 2014, Braunschweig. Influence of adjuvants and interactions between herbicides and weed species by determination of relative adjuvant-effect on herbicide dose. Braunschweig: **26th German Conference on Weed Biology and Weed Control**, p. 645-652, Mar.2014.

ASOCIACIÓN LATINO AMERICANA DE MALEZAS. Recomendaciones sobre unificación de los sistemas de evaluación en ensayos de control de malezas. **ALAM**, Bogotá, v. 1, n. 1, p. 35-38, 1974.

BARROSO, A. A. **Caracterização genética e foliar de capim-amargoso resistente ao herbicida glyphosate e eficácia de seu controle com associação de herbicidas**. 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado) em Agronomia, Fitotecnia, Universidade Estadual de São Paulo, Esalq, Piracicaba, 2011.

BAUR, P.; APONTE, J. Co-penetration of actives and adjuvants and its significance for the matched pair liaison. Retention, uptake, and translocation of agrochemicals in Plants, **American Chemical Society**, p.23-39, jan. 2014.

CHACHALIS, D. et al. Characterization of leaf surface, wax composition, and control of redvine and trumpetcreeper with glyphosate. **Weed Science**, v. 49, n. 2, p.156-163, mar. 2001.

COSTA, L. L. et al. Droplet spectra and surface tension of spray solutions by biological insecticide and adjuvants. **Engenharia Agrícola**, v. 37, n. 2, p.292-301, abr. 2017.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos Biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2012. (514).

DECARO JUNIOR, S. T.; FERREIRA, M. da C.; LASMAR, O. Physical characteristics of oily spraying liquids and droplets formed on coffee leaves and glass surfaces. **Engenharia Agrícola**, v. 35, n. 3, p.588-600, 2015.

DECARO, R. A.; DECARO JUNIOR, S. T.; FERREIRA, M. C. Deposit of pesticides without and with adjuvants on citrus seedlings following different intervals of artificial rain. **Ciência Rural**, v. 46, n. 1, p.13-19, 2016.

DENIS M. H. E DEROT S. Carrier-mediated uptake of glyphosate in broad bean (*Vicia faba*) via phosphate transporter. **Plant Physiology**, v. 87, p. 568-575, 1993.

DILL, G. M. Glyphosate-resistant crops: history, status and future. **Pest Management Science**, v. 61, n. 3, p.219-224, 2005.

GOMES, G. L. G. C.; CARBONARI, C.A.; VELINI, E.D.; TRINDADE, M.L.B.; SILVA, J.R.M. Extraction and simultaneous determination of glyphosate, AMPA and compounds of the shikimic acid pathway in plants. **Planta Daninha**, v. 33, n. 2, p. 295-304, 2015.

HEAP, I. **Herbicide Resistant Sourgrass Globally (*Digitaria insularis*)**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/Summary/Species.aspx>>. Acesso em: 01 jan.

2017.

HEIDARY, M. Al et al. Influence of spray characteristics on potential spray drift of field crop sprayers: A literature review. **Crop Protection**, v. 63, p.120-130, set. 2014.

HILZ, E.; VERMEER, A. W.P. Spray drift review: The extent to which a formulation can contribute to spray drift reduction. **Crop Protection**, v. 44, p.75-83, fev. 2013.

IOST, C. A. R.; RAETANO, C.G. Tensão superficial dinâmica e ângulo de contato de soluções aquosas com surfatantes em superfícies artificiais e naturais. **Engenharia Agrícola**, v. 30, n. 4, p.670-680, 2010.

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, 03 jan. 2008.

MELO, M. S. **Levantamento de ocorrência, alternativas de manejo, mecanismos de resistência e herança genética do capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao herbicida glyphosate**. 2015. 109 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Fitotecnia, Universidade Estadual de São Paulo, Esalq, Piracicaba, 2015.

MILLER, D. R.; STOUGHTON, T. E. Response of spray drift from aerial applications at a forest edge to atmospheric stability. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 100, p. 49-58, 2000.

MORIN, F. et al. Glyphosate uptake in *Catharanthus roseus* cells: role of a phosphate transporter. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 58, n. 1, p.13-22, 1997.

NAIRN, J. J.; FORSTER, W. A.; VAN LEEUWEN, R. M. Effect of solution and leaf surface polarity on droplet spread area and contact angle. *Pest Management Science*, v. 72, n. 3, p.551-557, 2015.

OLIVEIRA, R B de; ANTUNIASSI, U R.; GANDOLFO, M. A. Spray adjuvant characteristics affecting agricultural spraying drift. **Engenharia Agrícola**, v. 35, n. 1, p.109-116, jan. 2015.

ROMAN, E. S. et al. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. Passo Fundo: Berthier, 2007. 159 p.

REAM, J. E. et al. EPSPS synthase: binding studies using isothermal titration microcalorimetry and equilibrium dialysis and their implications for ligand recognition and kinetic mechanism. **Biochemistry**, 34, p. 5528-5534, 1992.

RODRIGUES B. N.; ALMEIDA F. S. **Guia de herbicidas**. 6ª edição. Londrina, PR. 697 p, 2013.

SANTOS, S. A. et al. Influence of shading on the leaf morphoanatomy and tolerance to glyphosate in *Commelina benghalensis* L. and *Cyperus rotundus* L. **Australian Journal Of Crop Science**, v. 2, n. 9, p.135-142, 2015.

SOUZA, R.T.; VELINI, E. D.; PALLADINI, L. A.. Aspectos metodológicos para análise de depósitos de pulverizações pela determinação dos depósitos pontuais. **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p.195-202, 2007.

PALLADINI, L. A.; RAETANO, C. G.; VELINI, E. D. Choice of tracers for the evaluation of spray deposits. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 5, p. 440-445, out. 2005.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal histochemistry and citochemistry**. 27, p. 137-138, 1965.

## 4 CAPÍTULO 3

### FORMULAÇÕES DE GLYPHOSATE E ADJUVANTES NA ABSORÇÃO, METABOLISMO E CONTROLE DE *Digitaria insularis* RESISTENTE E SUSCETÍVEL AO HERBICIDA

#### 4.1 RESUMO

O conhecimento dos mecanismos de resistência do capim amargoso (*Digitaria insularis*) ao glyphosate, em conjunto com a tecnologia de aplicação são características importantes na busca por métodos mais eficazes de controle desta espécie daninha. Logo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de formulações de glyphosate e adjuvantes na absorção, metabolismo e controle de populações de *D. insularis* suscetível e resistente ao herbicida. Para isso, dois ensaios foram conduzidos em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os tratamentos foram organizados em arranjo fatorial 2x2x5+2: duas populações (resistente e suscetível), duas formulações de glyphosate (SL e WG), cinco combinações (sem adjuvante e os adjuvantes éster metílico de óleo de soja, óleo mineral, alquil éster etoxilado, polioxietileno alquilfenol éter), mais dois tratamentos testemunhas (populações resistente e suscetível, sem aplicação). O herbicida foi aplicado na dose de 1080 g e.a. ha<sup>-1</sup> e as concentrações dos adjuvantes seguiram recomendação comercial para o controle de plantas daninhas. No momento da aplicação as plantas encontravam-se no estágio de 2 a 4 perfilhos (0,20 e 0,40 m de altura). A determinação da absorção de glyphosate e quantificação dos compostos: ácido chiquímico, tirosina, triptofano, fenilalanina e ácido aminometilfosfônico (AMPA) foi feita 24 horas após a aplicação do herbicida (24 HAA), com quantificação simultânea por cromatografia líquida e espectrometria de massas (LC/MS-MS). O controle das populações foi avaliado com base em escala de notas dos sintomas visuais e da porcentagem da redução de massa seca, em relação à testemunha (sem aplicação). Os resultados revelaram que a absorção do glyphosate aumenta com a adição dos adjuvantes: éster metílico de óleo de soja, óleo mineral e alquil éster etoxilado às caldas, não havendo diferença na absorção entre populações suscetível e resistente. Entretanto, o acúmulo de ácido chiquímico e redução da produção de aminoácidos aromáticos foi maior na população suscetível, em comparação à resistente. Os resultados sugerem que o mecanismo de resistência de *D. insularis* não esteja envolvido com menor absorção do

glyphosate e metabolização do herbicida pela planta daninha.

**Palavras-Chave:** resistência a herbicidas, capim-amargoso, mecanismo de resistência, ácido aminometilfosfônico, ácido chiquímico.

## GLYPHOSATE FORMULATIONS AND ADJUVANTS IN UPTAKE, METABOLISM AND CONTROL OF *Digitaria insularis* RESISTANT AND SUSCEPTIBLE TO HERBICIDE

### 4.2 ABSTRACT

The knowledge of the resistance mechanisms of sourgrass (*Digitaria insularis*) to glyphosate, together with the application technology is a relevant characteristic in the search of more efficient control methods this weed species. Therefore, the present work aimed to evaluate the influence glyphosate formulations and adjuvant on the uptake, metabolism and control of susceptible and resistant *D. insularis* populations to herbicide. For this, two trials were conducted in greenhouse in a completely randomized design, with five replications. The treatments were arranged in scheme factorial 2 x 2 x 5 + 2: two populations (susceptible and resistant), two formulations of glyphosate (SL and WG), five combinations (without adjuvant and plus addition of methyl ester of soybean oil, mineral oil, ethoxylated alkyl ester, and polyoxyethylene alkylphenol ether adjuvant), plus two control treatments (resistant and susceptible populations, without application). The herbicide was applied at the dose of 1080 g e.a. ha<sup>-1</sup> and the adjuvant concentrations followed commercial recommendation to weed control. At moment of application the plants were in the stage of 2 to 4 tillers (0.20 and 0.40 m high). The determination of glyphosate uptake and quantification of the compounds: shikimic acid, tyrosine, tryptophan, phenylalanine and aminomethylphosphonic acid (AMPA) was done 24 hours after application of the herbicide (HAA), using liquid chromatography and mass spectrometry (LC/MS-MS). Population control was assessed on the basis of visual symptom scores and the percentage of dry mass reduction in relation to the control treatment (without application). The results showed that the absorption of glyphosate increased with the addition of methyl ester of soybean oil, mineral oil and ethoxylated alkyl ester adjuvants, and there was no difference in the absorption between susceptible and resistant populations. However, the accumulation of shikimic acid and reduction of the aromatic amino acid was higher in the susceptible population, in comparison to the resistant one. The results suggest that the *D. insularis* resistance is not involved less glyphosate uptake and herbicide metabolism by weed plant.

**Key words:** herbicide resistance, sourgrass, resistance mechanism, shikimic acid.

### 4.3 INTRODUÇÃO

O Glyphosate, N-(fosfonometil) glicina, é um herbicida de pós-emergência, do grupo químico das glicinas substituídas, pertencente ao Grupo G (HRAC-BR, 2016). Seu mecanismo de ação envolve a ligação do herbicida à EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase) após a associação da molécula ao seu primeiro substrato, o composto chiquimato-3-fosfato (C3P) (SCHÖNBRUNN et al., 2001) formando o complexo EPSPs-S3P-glyphosate. A formação desse complexo resulta no acúmulo de ácido chiquímico no vacúolo e bloqueio da produção dos aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina) essenciais ao crescimento e desenvolvimento vegetal (FRANZ et al., 1997).

Entre as plantas daninhas que apresentam recomendação para o controle pelo glyphosate, destaca-se a *Digitaria insularis*. Essa espécie é uma planta daninha perene, de propagação tanto por sementes, quanto por rizomas. Essa planta daninha passou a ter importância nas regiões agrícolas brasileiras a partir da ocorrência do primeiro relato de resistência, identificado em 2008, no oeste do estado do Paraná (HEAP, 2017).

Alguns trabalhos identificaram que a resistência desta espécie daninha está associada a um conjunto de quatro mecanismos distintos, entre eles, a diferença na taxa e na absorção total do herbicida (CARVALHO et al., 2012). Entretanto, trabalhos recentes, encontraram que a absorção e a diferenciação enzimática não seriam os mecanismos pelos quais a *D. insularis* manifesta resistência ao glyphosate (MELO, 2015). Sendo assim, maiores investigações sobre o tema são necessárias para melhor elucidação do assunto.

Esta planta daninha possui ainda quantidade acentuada de cera presente em sua superfície foliar, que normalmente confere dificuldades à penetração de substâncias com características hidrofílicas como o glyphosate (SATCHIVI, 2014). Assim, mesmo que a resistência não esteja associada à absorção, espera-se que mudanças na composição das caldas de aplicação possam proporcionar aumento na penetração e absorção do herbicida em *D. insularis*, com possíveis efeitos sobre a resposta no controle da planta daninha, de forma especial às populações resistentes.

O acúmulo do ácido chiquímico e a redução dos aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina) pode ser utilizado como indicativo da interação entre o herbicida glyphosate e a EPSPS. Logo, esse trabalho teve por objetivo

avaliar a influência de formulações de glyphosate e adjuvantes na absorção, produção de compostos da rota do ácido chiquímico e controle de populações de *D. insularis* suscetível e resistente ao herbicida.

#### 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação para avaliar a influência de formulações de glyphosate e adjuvantes sobre a absorção, produção de compostos da rota do ácido chiquímico e controle de *D. insularis*. Os ensaios foram instalados no dia 01.09.2016, sendo conduzidos em casa de vegetação do Departamento de Proteção Vegetal (22°50'41.20"S; 48°26'6.65"O) da Universidade Estadual Paulista, FCA/UNESP, Campus de Botucatu, SP.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os tratamentos foram organizados em arranjo fatorial 2 x 2 x 5+2, sendo duas populações de *D. insularis* [suscetível (S) e resistente (R)], duas formulações de glyphosate (sal de isopropilamina e sal de amônio), cinco combinações [(sem adjuvante, e com os adjuvantes polioxietileno alquilfenol éter (Iharaguen-s<sup>®</sup>), óleo mineral (Nimbus<sup>®</sup>), alquil ester etoxilado de ácido fosfórico (Lanzar<sup>®</sup>) e éster metílico de óleo de soja (Aureo<sup>®</sup>)] mais dois tratamentos testemunha (população suscetível e resistente, sem aplicação), totalizando 22 tratamentos. As formulações de glyphosate foram aplicadas na dose de 1080 g e.a.ha<sup>-1</sup> e os adjuvantes foram adicionados às caldas de pulverização seguindo a recomendação para o controle de plantas daninhas, conforme a Tabela 20.

As populações de *D. insularis* R (Fator de resistência de 13,56) e S ao glyphosate, usadas nos experimentos foram previamente caracterizadas em ensaio de curva dose-resposta, sendo estas correspondentes as populações 49 e 60, apresentadas no capítulo 1 (Subitem 2.5.5). A semeadura dos ensaios foi feita em vasos de polietileno com capacidade de 1 L e preenchidos com substrato comercial (Carolina Soil<sup>®</sup>). Após a emergência das plantas foi feito o desbaste das mesmas, deixando-se três plantas distribuídas em cada vaso. Cada vaso representou a unidade experimental.

A aplicação dos tratamentos foi feita em laboratório, utilizando água destilada, sob condições ambientais controladas: temperatura de 24°C, umidade relativa de 60% e ausência de ventos. Quando as plantas atingiram o estágio de 2 a 4 folhas completamente expandidas, utilizando-se um sistema de pulverização móvel com

controle de velocidade e pressão. O sistema foi equipado com barra de 3,0 m de comprimento, contendo pontas de jato plano do tipo AXI 11003 (Jacto<sup>®</sup>), espaçadas de 0,5 m. O equipamento foi regulado para operar à pressão de 200 kPa, em velocidade de deslocamento de 5 km.h<sup>-1</sup>, provendo volume de calda correspondente a 200 L.ha<sup>-1</sup>.

**TABELA 21** - DESCRIÇÃO DOS TRATAMENTOS ENVOLVENDO POPULAÇÕES DE *D. INSULARIS* (POP.) SUSCETÍVEL (S) E RESISTENTE (R); FORMULAÇÕES DE GLYPHOSATE [I.A (SL E WG)] E ADJUVANTES (MARCA COMERCIAL), COM RESPECTIVA DOSE DE GLYPHOSATE + ADJUVANTE (G E.A. HA-1+ V.V-1).

Pop.	Formulação	Adjuvante	Dose [(g. ha <sup>-1</sup> +v.v <sup>-1</sup> (%))]
1 - S	-	-	-
2 - S	Sal isopropilamina (SL <sup>1</sup> )	-	1080
3 - S	Sal isopropilamina (SL)	Aureo <sup>®</sup>	1080 + 0,1 (%)
4 - S	Sal isopropilamina (SL)	Nimbus <sup>®</sup>	1080 + 0,5 (%)
5 - S	Sal isopropilamina (SL)	Lanzar <sup>®</sup>	1080 + 0,5 (%)
6 - S	Sal isopropilamina (SL)	Iharaguen-s <sup>®</sup>	1080 + 0,01 (%)
7 - S	Sal Amônio (WG <sup>2</sup> )	-	1080
8 - S	Sal Amônio (WG)	Aureo <sup>®</sup>	1080 + 0,1 (%)
9 - S	Sal Amônio (WG)	Nimbus <sup>®</sup>	1080 + 0,5 (%)
10 - S	Sal Amônio (WG)	Lanzar <sup>®</sup>	1080 + 0,5 (%)
11 - S	Sal Amônio (WG)	Iharaguen-s <sup>®</sup>	1080 + 0,01 (%)
12 - R	-	-	-
13 - R	Sal isopropilamina (SL)	-	1080
14 - R	Sal isopropilamina (SL)	Aureo <sup>®</sup>	1080 + 0,1 (%)
15 - R	Sal isopropilamina (SL)	Nimbus <sup>®</sup>	1080 + 0,5 (%)
16 - R	Sal isopropilamina (SL)	Lanzar <sup>®</sup>	1080 + 0,5 (%)
17 - R	Sal isopropilamina (SL)	Iharaguen-s <sup>®</sup>	1080 + 0,01 (%)
18 - R	Sal Amônio (WG)	-	1080
19 - R	Sal Amônio (WG)	Aureo <sup>®</sup>	1080 + 0,1 (%)
20 - R	Sal Amônio (WG)	Nimbus <sup>®</sup>	1080 + 0,5 (%)
21 - R	Sal Amônio (WG)	Lanzar <sup>®</sup>	1080 + 0,5 (%)
22 - R	Sal Amônio (WG)	Iharaguen-s <sup>®</sup>	1080 + 0,01 (%)

<sup>1</sup>Roundup Original<sup>®</sup>; <sup>2</sup>Roundup WG<sup>®</sup>

#### 4.4.1 Absorção de glyphosate e determinação simultânea de compostos pertencentes à rota do ácido chiquímico

O ensaio para determinação dos referidos compostos foi conduzido no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM) da FCA/UNESP, Campus de Botucatu, SP. A semeadura da *D. insularis* e a aplicação dos tratamentos foram realizadas nos dias 01/07/2016 e 16/08/2016, respectivamente.

Foram utilizadas cinco repetições por tratamento representadas por vasos contendo três plantas cada. Após a aplicação dos tratamentos, as plantas foram deixadas por 24 horas em casa de vegetação. Em seguida, foram cortadas rente à superfície do solo e armazenadas em sacos de polietileno, previamente identificados.

O glyphosate presente na superfície das plantas foi removido por meio da lavagem com 300 ml de água destilada, adicionada em três vezes de 100 mL. As amostras foram então levadas para secar em estufa, com circulação de ar forçada, a  $65 \pm 5$  °C, até que apresentassem massa constante. Logo em seguida, as plantas foram armazenadas em freezer até serem maceradas utilizando-se nitrogênio líquido. Os demais procedimentos utilizados nesse ensaio seguiram metodologia descrita por Gomes et al. (2015). O glyphosate absorvido e o ácido chiquímico foram quantificados simultaneamente por técnica de cromatografia e espectrometria de massas (LC-MS/MS).

#### **4.4.2 Controle de populações de *D. insularis***

As avaliações de controle foram feitas com base nos sintomas visuais e na massa seca residual, aos 21 DAA. Para isso, foi utilizada uma escala atribuindo-se notas que variaram entre 0% (ausência de sintomas) e 100% (morte das plantas), conforme Asociación Latinoamericana de Malezas (1974). As plantas foram então cortadas rente à superfície do solo e armazenadas em sacos de papel devidamente identificados. Posteriormente, foram levadas para secagem em estufa de circulação de ar forçada sob temperatura de  $65 \pm 5$  °C até que atingissem massa constante. Em seguida, as plantas foram pesadas em balança analítica de precisão e os dados foram utilizados para cálculo da porcentagem de massa seca, em relação à testemunha (sem aplicação).

#### **4.4.3 Análise estatística**

Inicialmente, os dados foram submetidos aos testes de Levene ( $P > 0,05$ ) e Shapiro Wilk ( $P > 0,05$ ), para a verificação da homocedasticidade e normalidade dos erros, respectivamente. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância e aplicação do teste F. Quando verificada diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ).

Adicionalmente, realizou-se análise de correlação para a associação entre as variáveis de absorção, compostos da rota do ácido chiquímico e controle das populações de *D. insularis* suscetível e resistente ( $P < 0,05$ ).

#### 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença significativa na absorção de glyphosate entre população resistente e suscetível (Tabela 21). No entanto foi constatada diferença no acúmulo de ácido chiquímico, em torno de 4 vezes maior na população suscetível (S), quando comparada a população resistente (R). Isso indica que apesar de haver semelhança na absorção entre populações R e S, a interação do herbicida glyphosate com a enzima alvo (EPSPS) é expressivamente distinta. Tais resultados corroboram com os encontrados por Melo (2011 e 2015), que constatou haver semelhança na absorção do glyphosate entre populações de *D. insularis* R e S ao herbicida, e diferença na produção do ácido chiquímico entre essas populações.

Na população suscetível, a quantidade de ácido chiquímico encontrada na testemunha foi aproximadamente 10 vezes menor em relação aos tratamentos herbicidas. Por outro lado, na população resistente, apenas dois tratamentos herbicidas apresentaram maior quantidade de ácido chiquímico em comparação à testemunha, sem aplicação. Estes tratamentos foram compostos pelas associações entre os adjuvantes Lanza<sup>®</sup> e Iharaguen-s<sup>®</sup> e a formulação SL, com incremento de até 2,4 vezes da quantidade de ácido chiquímico acumulado. Sendo assim, espera-se que estes tratamentos possam contribuir, pelo menos em parte, para o controle da *D. insularis* resistente, mesmo que este não atinja níveis satisfatórios.

A única diferença significativa encontrada entre as formulações herbicida foi constatada na população suscetível. Nesta população, o adjuvante a base de éster metílico de óleo de soja (Aureo<sup>®</sup>) associado à formulação SL proporcionou maior absorção do glyphosate em comparação à formulação WG. Essa diferença foi de aproximadamente 30% a mais obtida para a primeira formulação, em relação à WG, demonstrando a maior afinidade da associação entre os produtos de composição oleosa.

A adição dos adjuvantes Aureo<sup>®</sup>, Nimbus<sup>®</sup> e Lanza<sup>®</sup> proporcionou incremento significativo na absorção, sendo este comportamento observado tanto na população resistente quanto na suscetível. Os incrementos na absorção chegaram a 170% com

a adição do adjuvante Nimbus® à formulação SL e 113% com a adição do adjuvante Lanza® à formulação WG, em comparação às formulações sem associação aos adjuvantes. Esses resultados evidenciam haver benefícios na adição de adjuvantes oleosos em mistura ao glyphosate.

Em resposta ao incremento na absorção proporcionada pelos adjuvantes oleosos houve aumento da quantidade de ácido chiquímico acumulado identificado nas plantas suscetíveis ao herbicida. O mesmo comportamento não foi observado para a população resistente, na qual o incremento na absorção não apresentou resposta ao aumento da quantidade de ácido chiquímico, reforçando a informação sobre a menor interação do herbicida com a enzima EPSPS.

**TABELA 22** - ABSORÇÃO DE GLYPHOSATE ( $\mu\text{g. g}^{-1}$ ) E ÁCIDO CHIQUÍMICO ACUMULADO ( $\mu\text{g. g}^{-1}$ ) EM POPULAÇÕES DE *D. INSULARIS* SUSCETÍVEL (S) E RESISTENTE (R), 24 HORAS APÓS A APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS HERBICIDAS.

Pop. (P)	Adj. (A)	Formulação (F)			
		SL	WG	SL	WG
		-----Absorção ( $\mu\text{g. g}^{-1}$ )-----		----Ácido Chiquímico ( $\mu\text{g. g}^{-1}$ )-----	
S	-	2,5 aaAA $\alpha\alpha$	3,2 aaAA $\alpha\alpha$	472,6 bbAA $\alpha\alpha$	560,0 bbAA $\alpha\alpha$
	Aureo	5,8 aaBB $\beta\beta$	4,0 aaAA $\alpha\alpha$	679,0 bbAA $\beta\gamma$	606,8 bbAA $\alpha\beta$
	Nimbus	6,8 aaAA $\beta\beta$	5,1 aaAA $\alpha\alpha$	657,5 bbAA $\beta\gamma$	647,4 bbAA $\alpha\beta$
	Lanza	6,5 aaAA $\beta\beta$	5,5 aaAA $\alpha\alpha$	744,0 bbAA $\gamma\gamma$	745,4 bbAA $\beta\beta$
	Ihar.	2,9 aaAA $\alpha\alpha$	3,4 aaAA $\alpha\alpha$	557,0 bbAA $\alpha\beta$	513,2 bbAA $\alpha\alpha$
Test (S)		-		52,0*	
R	-	3,19 aaAA $\alpha\alpha$	2,91aaAA $\alpha\alpha$	126,9 aaAA $\alpha\alpha^*$	137,0 aaAA $\alpha\alpha^*$
	Aureo	5,95 aaAA $\beta\gamma$	4,42aaAA $\alpha\beta$	169,9 aaAA $\alpha\alpha^*$	153,6 aaAA $\alpha\alpha^*$
	Nimbus	5,16 aaAA $\alpha\beta\gamma$	4,65aaAA $\alpha\beta$	162,8 aaAA $\alpha\alpha^*$	173,4 aaAA $\alpha\alpha^*$
	Lanza	6,77 aaAA $\gamma\gamma$	6,21aaAA $\gamma\gamma$	224,4 aaAA $\alpha\alpha$	160,0 aaAA $\alpha\alpha^*$
	Ihar.	3,68 aaAA $\alpha\beta$	2,46 aaAA $\alpha\alpha$	188,8 aaAA $\alpha\alpha$	130,8 aaAA $\alpha\alpha^*$
Test (R)		-		94,0*	
CV%		$F_p: 0,0^{ns}; F_f: 7,0^{**}; F_a: 22,1^{**}$		$F_p = 774,7^{**}; F_f = 0,9^{ns}; F_a = 9,1^{**}$	
30,31		$F_{pxf} = 0,09^{ns}; F_{pxa} = 1,0^{ns};$		$F_{pxf} = 0,24^{ns}; F_{pxa} = 4,18^{**}$	
20,95		$F_{fxa} = 1,33^{ns}; F_{pxfxa} = 0,9^{ns}$		$F_{fxa} = 1,25^{ns}; F_{pxfxa} = 0,59^{ns}$	
		-		$F_{fatxtest(S)}: 141.77^{**};$	

O primeiro par de letras minúsculas compara as populações nas formulações de glyphosate e adjuvantes. O segundo par de letras maiúsculas compara as formulações de glyphosate nas populações de *D. insularis* e adjuvantes. O terceiro par de letras gregas compara os adjuvantes nas populações e formulação. Tratamentos com letras iguais, na comparação de cada fator, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \*Significativo a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) \*\*Significativo a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ), <sup>ns</sup>não significativo ( $p > 0,05$ ). A comparação da testemunha com os demais tratamentos foi feita pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

Houve diferença significativa na quantidade de aminoácidos 24 horas após a aplicação do glyphosate entre a população resistente e suscetível (Tabela 22). Maiores quantidades de aminoácidos foram identificadas na população resistente, o que indica menor bloqueio na rota metabólica do ácido chiquímico nesta população. Adicionalmente, observa-se que na população resistente houve incremento da produção do aminoácido fenilalanina, em comparação ao tratamento testemunha, sem aplicação. Este fato revela que houve estímulo da produção deste aminoácido em plantas da população resistente, após a aplicação do glyphosate.

Segundo Belz (2014), o estímulo ao crescimento e produção de compostos favoráveis ao desenvolvimento das plantas em resposta à aplicação de herbicida é um fenômeno conhecido como hormesis. Este fenômeno normalmente ocorre quando plantas são expostas a subdoses de herbicidas. Entretanto, plantas daninhas resistentes podem manifestar o mesmo efeito quando submetidas à dose comercial do herbicida.

Na população resistente, nenhum dos tratamentos herbicidas foi capaz de reduzir a quantidade de aminoácidos nos tecidos da planta, em comparação ao tratamento testemunha, sem aplicação. Por outro lado, na população suscetível houve redução significativa da quantidade de aminoácidos nos tecidos da planta, para a maior parte dos tratamentos. Este fato revela, mais uma vez, a ineficiência no bloqueio da rota metabólica pelo glyphosate na população resistente quando comparada à população suscetível.

As únicas diferenças significativas encontradas entre a comparação das formulações herbicidas na quantidade dos aminoácidos presentes nos tecidos da *D. insularis* foram verificadas na população resistente. Nesta, foi encontrada menor quantidade do aminoácido fenilalanina quando o adjuvante Lanza<sup>®</sup> foi associado à formulação SL, em comparação à WG. Outra diferença foi constatada para o aminoácido tirosina, no qual o adjuvante Iharaguen-s<sup>®</sup> adicionado em mistura à formulação WG apresentou menor quantidade de tirosina, em comparação à mistura deste adjuvante na formulação SL. Esses resultados indicam haver efeitos positivos na mistura entre de adjuvantes e formulações herbicidas com polaridade semelhante.

Menores quantidades dos aminoácidos fenilalanina e tirosina foram identificadas na população suscetível quando esta foi submetida à aplicação das misturas contendo os adjuvantes Aureo<sup>®</sup> e Lanza<sup>®</sup> adicionados à formulação SL. Este fato

revela haver maior potencial de controle de *D. insularis*, quando essas misturas são utilizadas.

Nesta população, a associação do adjuvante Lanza® à formulação SL proporcionou maior porcentagem de controle visual (C) e redução da porcentagem de matéria seca (MS) em relação à associação com a formulação WG. Por outro lado, a associação do Aureo® as formulações SL e WG proporcionou menores níveis de controle, 21,3% e 18,67%, respectivamente em população resistente ao glyphosate. Apesar disso, as formulações herbicidas e os adjuvantes contribuíram com o controle da população resistente (R) proporcionando menor MS na formulação WG, em comparação à formulação SL, o que evidencia a dependência nas associações entre adjuvantes e formulações para a obtenção de melhores resultados de controle.

Houve redução de até 74% da quantidade de matéria seca da população resistente quando esta foi submetida aos tratamentos que utilizaram os adjuvantes Aureo® e Nimbus® em associação à formulação WG, e os adjuvantes Nimbus®, Lanza® em associação à formulação SL, indicando haver controle parcial da população resistente. No entanto, as formulações herbicidas isoladas não foram capazes de reduzir a matéria seca da população resistente em comparação ao tratamento testemunha.

**TABELA 23** - AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS: FENILALANINA, TIROSINA E TRIPTOFANO ( $\mu\text{g. G}^{-1}$ ) EM *D. INSULARIS*, 24 HORAS APÓS A APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS

Pop. Adj.		Formulação (F)					
(P)	(A)	SL	WG	SL	WG	SL	WG
		-----Fenilalanina ( $\mu\text{g. g}^{-1}$ )-----		-----Tirosina ( $\mu\text{g. g}^{-1}$ )-----		-----Triptofano ( $\mu\text{g. g}^{-1}$ )-----	
S	-	363,80aaAA $\beta\beta^*$	315,60aaAA $\alpha\alpha^*$	319,20aaAA $\beta\beta^*$	267,40aaAA $\alpha\alpha$	185,20aaAA $\alpha\alpha^*$	170,80aaAA $\alpha\alpha$
	Aureo	246,40aaAA $\alpha\alpha$	307,20aaAA $\alpha\alpha$	215,00aaAA $\alpha\alpha$	249,40aaAA $\alpha\alpha$	163,80aaAA $\alpha\alpha$	180,60aaAA $\alpha\alpha^*$
	Nimbus	307,75aaAA $\alpha\beta$	290,00aaAA $\alpha\alpha$	237,50aaAAab	235,40aaAA $\alpha\alpha$	180,00aaAA $\alpha\alpha^*$	162,40aaAA $\alpha\alpha$
	Lanzar	268,00aaAA $\alpha\alpha$	254,60aaAA $\alpha\alpha$	195,20aaAA $\alpha\alpha$	205,20aaAA $\alpha\alpha$	166,40aaAA $\alpha\alpha$	160,80aaAA $\alpha\alpha$
	Ihar.	299,80aaAA $\alpha\beta$	302,80aaAA $\alpha\alpha$	273,60aaAAab	254,00aaAA $\alpha\alpha$	181,40aaAA $\alpha\alpha^*$	170,80aaAA $\alpha\alpha$
Test (S)		387,20*		343,60*		215,00*	
R	-	422,20aaAA $\beta\beta$	435,80bbAA $\alpha\alpha$	344,80aaAA $\alpha\alpha^*$	335,60bbAA $\alpha\alpha^*$	196,00aaAA $\alpha\alpha^*$	205,20aaAA $\alpha\alpha^*$
	Aureo	466,40bbAA $\beta\beta$	415,60bbAA $\alpha\alpha$	371,20bbAA $\alpha\alpha$	331,40bbAA $\alpha\alpha^*$	202,40aaAA $\alpha\alpha^*$	187,40aaAA $\alpha\alpha^*$
	Nimbus	399,80bbAA $\alpha\beta$	387,80bbAA $\alpha\alpha^*$	339,20bbAA $\alpha\alpha^*$	325,00bbAA $\alpha\alpha^*$	186,20aaAA $\alpha\alpha^*$	180,20aaAA $\alpha\alpha^*$
	Lanzar	358,60bbAA $\alpha\alpha^*$	426,00bbBB $\alpha\alpha$	296,60bbAA $\alpha\alpha^*$	327,00aaAA $\alpha\alpha^*$	160,40aaAA $\alpha\alpha^*$	183,80aaAA $\alpha\alpha^*$
	Ihar.	401,00bbAAbb	419,40bbAA $\alpha\alpha$	358,80bbBB $\alpha\alpha^*$	297,40bbAA $\alpha\alpha^*$	188,40aaAA $\alpha\alpha^*$	220,00bbAA $\alpha\alpha^*$
Test (R)		298,75*		269,25*		171,25*	
CV (%):		$F_p = 138,42^{**}$ ; $F_f = 0,04^{ns}$ ; $F_a = 3,49^*$ ;		$F_p = 87,56^{**}$ ; $F_f = 1,74^{ns}$ ; $F_a = 4,43^{**}$		$F_p = 8,5^{**}$ ; $F_f = 0,0^{ns}$ ; $F_a = 1,7^{ns}$ 1,67 <sup>ns</sup>	
Abs. = 30,31		$F_{pxf} = 0,27^{ns}$ ; $F_{pxa} = 1,87^{ns}$ ;		$F_{pxf} = 0,49^{ns}$ ; $F_{pxa} = 2,19^{ns}$		$F_{pxf} = 1,34^{ns}$ ; $F_{pxa} = 0,32^{ns}$	
Ác. = 20,95		$F_{fxa} = 0,68^{ns}$ ; $F_{pxfxa} = 2,82^*$		$F_{fxa} = 1,31^{ns}$ ; $F_{pxfxa} = 1,26^{ns}$		$F_{fxa} = 0,40^{ns}$ ; $F_{pxfxa} = 0,97^{ns}$	
		$F_{fatxtest(S)}: 19,96^{**}$ ; $F_{fatxtest(R)}: 22,06^{**}$		$F_{fatxtest(S)}: 29,04^{**}$ ; $F_{fatxtest(R)}: 7,16^*$		$F_{fatxtest(S)}: 19,54^{**}$ ; $F_{fatxtest(R)}: 1,18^{ns}$	

O primeiro par de letras minúsculas compara as populações nas formulações de glyphosate e adjuvantes. O segundo par de letras maiúsculas compara as formulações de glyphosate nas diferentes populações de *D. insularis* e adjuvantes. O terceiro par de letras gregas compara os adjuvantes nas diferentes populações e formulação. Tratamentos com letras iguais, na comparação de cada fator, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \*Significativo a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) \*\*Significativo a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ), <sup>ns</sup>não significativo ( $p > 0,05$ ). A comparação da testemunha com os demais tratamentos foi realizada pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ )

**TABELA 24** - NOTAS DOS SINTOMAS VISUAIS DE CONTROLE (%) E MASSA SECA RESIDUAL (%) DE *D. INSULARISAOS* 21 DIAS APÓS A APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS.

Pop. (P)	Adj. (A)	Formulação (F)			
		SL	WG	SL	WG
		-----Controle (%)-----		-----Massa seca residual (%)-----	
S	-	98,5 bbAAαα	98,5 bbAAαα	17,9 aaAAαα	22,5 aaAAαα
	Aur.	98,5 bbAAαα	98,5 bbAAαα	22,5 aaAAαα	17,3 aaAAαα
	Nim.	100,0 bbAAαα	100,0 bbAAαα	28,5 aaAAαα	22,9 aaAAαα
	Lanz	100,0 bbAAαα	100,0 bbAAαα	23,4 aaAAαα	28,2 aaAAαα
	lhar.	96,2 bbAAαα	96,2 bbAAαα	18,1 aaAAαα	15,4 aaAAαα
	Test (S)	-		100*	
R	-	27,83 aaBBαα	16,17 aaAAαα	60,82 bbAAαβ*	57,03 bbAAαβ*
	Aur.	21,33 aaAAαβ	18,67 aaAAαα	76,22 bbBBββ*	47,08 bbAAαβ
	Nim.	33,83 aaAAαβ	38,50 aaAAββ	43,85 aaAAαβ	26,07 aaAAαα
	Lanz	54,33 aaBBγγ	23,67 aaAAαα	28,43 aaAAαα	52,82 aaAAαβ*
	lhar.	39,83 aaBBββ	20,83 aaAAαα	37,76 aaAAαα	82,81 bbBBββ*
	Test (R)	-		100*	
		$F_p = 2178,88^{**}; F_f = 14,90^{**}$		$F_p = 48,13^{**}; F_f = 0,12^{ns}$	
	CV (%)	$F_a = 7,12^{**}; F_{pxf} = 17,05^{**}$		$F_a = 0,88^{ns}; F_f = 0,29^{ns}$	
	C = 12.68	$F_{pxa} = 5,75^{**}; F_{fxa} = 3,98^{**}$		$F_{pxa} = 2,90^*; F_{fxa} = 2,97^*$	
	MS = 64.16	$F_{pxfxa} = 4,80^{**}$		$F_{pxfxa} = 2,3^{ns}; F_{fatxtest(S)} = 145,9^{**}$	
		-		$F_{fatxtest(R)} = 14,25^{**}$	

O primeiro par de letras, minúscula, compara as populações nas formulações de glyphosate e adjuvantes. O segundo par de letras, maiúscula, compara as formulações de glyphosate nas populações de *D. insularis* e adjuvantes. O terceiro par de letras, grega, compara os adjuvantes nas diferentes populações e formulação. Tratamentos com letras iguais, na comparação de cada fator, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \*Significativo a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) \*\*Significativo a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ), <sup>ns</sup>não significativo ( $p > 0,05$ ). A comparação da testemunha com os demais tratamentos foi realizada pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados é possível afirmar que o controle da população de *D. insularis* resistente ao glyphosate pode ser otimizado pelo uso de adjuvantes oleosos, com destaque ao alquil ester etoxilado do ácido fosfórico, com aumento da absorção e controle da planta daninha.

Apesar dos adjuvantes terem proporcionado incrementos consideráveis da absorção do herbicida, o bloqueio da rota metabólica, em plantas resistentes, não foi suficiente para garantir o controle satisfatório da planta daninha. Assim, é possível concluir que o mecanismo de resistência da *D. insularis* não está associado a redução da absorção pela planta, bem como a degradação do herbicida pela planta

resistente.

## REFERÊNCIAS

ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE MALEZAS. Recomendaciones sobre unificación de los sistemas de evaluación en ensayos de control de malezas. **ALAM**, Bogotá, v. 1, n. 1, p. 35-38, 1974.

BELZ, R. G et al. Herbicides and plant hormesis. **Pest Management Science**, v. 70, n. 5, p.698-707, 22 fev. 2014.

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, 18 jan. 2012.

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, jun. 2015.

HEAP, I. **Herbicide Resistant Sourgrass Globally (*Digitaria insularis*)**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/Summary/Species.aspx>>. Acesso em: 01 jan. 2017.

FRANZ, J.E.; MAO, M.K.; SIKORSKI, J.A. **Glyphosate**: a unique global herbicide. Washington: American Chemical Society, 1997. (Monograph, 189).

MELO, M. S. **Levantamento de ocorrência, alternativas de manejo, mecanismos de resistência e herança genética do capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao herbicida glyphosate**. 2015. 109 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade Estadual de São Paulo, Esalq, Piracicaba, 2015.

MELO, M. S.. **Alternativas de controle, acúmulo de chiquimato e curva de crescimento de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) suscetível e resistente ao glyphosate**. 2011. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia (Fototecnia), Universidade Estadual de São Paulo, Esalq, USP, Piracicaba, 2012.

SATCHIVI, N. M.. Modeling xenobiotic uptake and movement: a review. **Retention, uptake, and translocation of agrochemicals in plants**, p.41-74, jan. 2014.

SCHONBRUNN, E. et al. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 98, n. 4, p.1376-1380, 13 fev. 2001.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos dos aspectos da resistência do capim-amargoso possibilitaram identificar que a resistência ao glyphosate encontra-se em níveis alarmantes para as diferentes populações coletadas nos estados do Paraná e São Paulo. Além disso, foi constatada a presença de maiores níveis de resistência comparativamente aos resultados encontrados em anos anteriores a essa pesquisa, o que revela o aumento da magnitude da resistência dessa espécie daninha ao herbicida.

Ainda não foram encontrados casos de resistência ao herbicida clethodim, tampouco a resistência múltipla da espécie nas regiões onde os estudos foram feitos.

Apesar de não ter sido alvo da pesquisa, os estudos de sensibilidade a herbicidas evidenciaram que algumas populações de *D. insularis* apresentaram estímulo ao crescimento quando submetidas à aplicação do glyphosate, o que possivelmente possa estar relacionado ao efeito hormético identificado em algumas das populações que foram estudadas.

Os estudos da frequência de sensibilidade de populações aos herbicidas foram precisos em estimar a variabilidade das respostas das populações a aplicação do glyphosate, facilitando, assim, a comparação em pesquisas futuras, com possibilidade de usos em programas de monitoramento de diferentes espécies resistentes a herbicidas.

A aplicação de adjuvantes junto a caldas contendo glyphosate foi considerada uma medida útil, para garantia do melhor aproveitamento do herbicida no controle da *D. insularis* e prevenção da deriva das aplicações. No entanto, foi observado que os adjuvantes apresentam diferenças notórias entre eles sobre as diversas variáveis da tecnologia de aplicação e interação depósito-alvo, devendo as mesmas estar sendo observadas para a indicação quanto ao uso dos adjuvantes. Além disso, as relações de dependência entre os fatores formulação e adjuvante, revelaram que as recomendações devem ser realizadas observando a característica de dependência entre os fatores.

Na terceira etapa do trabalho foi visto que apesar dos adjuvantes terem proporcionado incrementos na absorção do herbicida pela população resistente, isso não foi suficiente para controlar de forma satisfatória a planta daninha. Assim, pode-se inferir que mecanismo de resistência da *D. insularis* não está envolvido a menor

absorção do herbicida pelas populações resistentes, bem como a metabolização do herbicida pela planta.

## REFERÊNCIAS

ADEGAS, F. S. et al. Diagnóstico da existência de *Digitaria insularis* resistente ao herbicida glyphosate no sul do Brasil. **XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS 19 A 23 DE JULHO DE 2010 - CENTRO DE CONVENÇÕES - RIBEIRÃO PRETO – SP**. Ribeirão Preto, p. 761-765. jun. 2010.

CARVALHO, L. B. de et al. Detection of sourgrass (*Digitaria insularis*) biotypes resistant to glyphosate in Brazil. **Weed Science**, v. 59, n. 02, p.171-176, jun. 2011.

HEAP, I. **GROUP G/9 RESISTANT SOURGRASS (*Digitaria insularis*)**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/Details/Case.aspx?ResistID=5350>>. Acesso em: 05 fev. 2017.

HEAP, I. **GROUP A/1 RESISTANT SOURGRASS (*Digitaria insularis*)**. 2017. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/Details/Case.aspx?ResistID=13043>>. Acesso em: 05 fev. 2017.

GEMELLI, A. et al. Aspectos da biologia de *Digitaria insularis* resistente ao glyphosate e implicações para o seu controle. **Revista Brasileira de Herbicidas**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.231-240, 10 ago. 2012.

