

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA, MATEMÁTICA E EDUCAÇÃO

ANA VITÓRIA SANCHES DA SILVA MELO

**VALIDAÇÃO DE TESTE PARA DETECTAR RESISTÊNCIA AO HERBICIDA
HALOXIFOP EM CAPIM-AMARGOSO**

ARARAS

2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA, MATEMÁTICA E EDUCAÇÃO

ANA VITÓRIA SANCHES DA SILVA MELO

VALIDAÇÃO DE TESTE PARA DETECTAR RESISTÊNCIA AO HERBICIDA
HALOXIFOP EM CAPIM-AMARGOSO

Monografia apresentada no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos, *campus* Araras, para obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Profa. Dra. Ane Hackbart de Medeiros

ARARAS

2025

Melo, Ana Vitória Sanches da Silva

Validação de teste para detectar resistência ao herbicida
haloxifop em capim-amargoso / Ana Vitória Sanches da Silva
Melo -- 2025.
22f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos,
campus Araras, Araras

Orientador (a): Ane Hackbart de Medeiros

Banca Examinadora: Margareth Lumy Sekiama, Vitor Hugo
Beloti

Bibliografia

1. manejo integrado de pragas, resistência de plantas à
herbicidas. I. Melo, Ana Vitória Sanches da Silva. II.
Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

*A Deus por nunca me desamparar, ao
meu esposo por sempre me ajudar.
Dedico este trabalho como agradecimento
por todo amor.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar essa oportunidade e por iluminar todos os meus caminhos nessa trajetória.

Ao meu amado esposo Gabriel Sanches, por ser meu grande amigo, me dar forças nas horas das dificuldades, por sempre colocar um sorriso no meu rosto, e por continuamente me incentivar e apoiar durante meus estudos. Sou imensamente grata pela paciência, amor e cuidado.

Aos meus queridos irmãos por compartilharem a jornada de vida comigo e torná-la mais divertida e interessante. Aos meus queridos sobrinhos Miguel e Davi Delgado por serem um raio de esperança em minha vida. Aos meus queridos sogros e cunhada por constantemente me incentivarem, a todos meus familiares que me apoiaram de alguma forma.

À Professora Dra. Ane Hackbart de Medeiros, agradeço por toda orientação e ensinamentos proporcionados ao longo da minha trajetória acadêmica.

Ao Dr. Marcelo Figueiredo, por todo apoio e orientação, agradeço por sua disposição em me auxiliar ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Marcel de Melo, pela oportunidade de integrar sua equipe no Laboratório de Monitoramento de Resistência a Plantas Daninhas, pelos ensinamentos e conselhos ao longo da minha trajetória profissional e acadêmica.

À Dra. Ana Cuenca, pela oportunidade de ingressar no Laboratório de Análise Molecular, pelo auxílio nos experimentos e análises estatísticas deste trabalho.

As parceiras de graduação e amigas, Gabriele Thaís de Oliveira, Viviane Giraldo Felisberto, Yasmin Pinheiro e Fernanda Rodrigues de Oliveira que tornaram essa trajetória mais leve.

À Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, e ao curso de Ciências Biológicas e todo o corpo docente por minha formação, pelas oportunidades oferecidas e todos os ensinamentos que levarei para a vida.

À banca examinadora pela disponibilidade.

À Bayer divisão Crop Science pela oportunidade de pesquisa.

RESUMO

A espécie *Digitaria insularis* é uma espécie invasora que diminui o rendimento das lavouras devido à sua elevada capacidade competitiva por recursos naturais, podendo reduzir a produtividade em até 80% em culturas anuais e perenes. O controle dessa planta invasora é frequentemente realizado com herbicidas inibidores de ACCase, que interferem na síntese de ácidos graxos e levam à morte celular de plantas suscetíveis, sem afetar as culturas cultivadas. No entanto, o uso contínuo e repetitivo desses herbicidas tem selecionado genótipos resistentes, reduzindo a eficácia do controle químico. A resistência está associada a mutações no gene que codifica a enzima ACCase, comprometendo sua ligação com o inibidor e diminuindo a eficiência dos herbicidas. Diante desse cenário, o monitoramento da resistência em *D. insularis* é fundamental para a implementação de estratégias de manejo mais eficientes e para a compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos. O presente estudo teve como objetivo validar por meio de teste PCR e sequenciamento genes de resistência a herbicidas inibidores de ACCase em *D. insularis*. Foram analisadas 18 amostras de possíveis genótipos resistentes, comparando com seis amostras de plantas controle, sabidamente suscetíveis. O DNA foi extraído por meio do QIAcube utilizando o DNeasy Plant Kit. A análise foi feita por meio de alinhamento e comparação de sequências, revelando que oito amostras apresentaram pelo menos um alelo resistente associado à mutação Trp2027Cys, enquanto uma amostra demonstrou resistência completa. Concluindo que a resistência de plantas invasoras a herbicidas é um problema que tem se tornado cada vez mais preocupante no campo. Com isso, faz-se necessário desenvolver testes rápidos e eficazes para o monitoramento do surgimento de genótipos resistentes entre as invasoras. O teste usado nesse projeto mostrou-se eficiente em detectar polimorfismos do gene da ACCase em genótipos de *D. insularis*, indicando que pode ser usado como um aliado em estratégias de monitoramento de genótipos resistentes.

Palavras-chave: resistência à herbicidas, monitoramento, capim-amargoso, inibidores de ACCase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 <i>Digitaria insularis</i>	9
2.2 Herbicidas inibidores da Acetil-CoA carboxilase	9
3. OBJETIVOS	11
3.1 Objetivo geral	12
3.2 Objetivos específicos	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 Material Vegetal e Crescimento	13
4.2 Amplificação do gene ACCase	13
4.3 Alinhamento do gene ACCase	14
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5.1 Mutação no gene que codifica ACCase em biótipos resistentes e suscetível de <i>Digitaria insularis</i>	16
6. CONCLUSÕES	18
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

1. INTRODUÇÃO

O capim-amargoso (*Digitaria insularis* (L.) Fedde) é uma espécie nativa de regiões tropicais e subtropicais da América, onde é frequentemente encontrado em pastagens, cafezais, pomares e em áreas ruderais como beira de estradas e terrenos baldios (Machado et al., 2008). *D. insularis* traz grandes prejuízos para as lavouras, por se tratar de uma espécie com grande capacidade competitiva para as culturas anuais e perenes (Christoffoleti et al., 2016).

Gemelli et al. (2012) destaca que com a inserção do sistema plantio direto a espécie cresceu sua importância na agricultura brasileira, em consequência das suas características agressivas como a formação de touceiras, rizomas e a disseminação de propágulos, uma vez que a planta se estabelece com o início da formação dos rizomas e posterior formação de grandes touceiras, tornando-se de difícil controle.

Mais recentemente, a importância da infestação de áreas agrícolas por capim-amargoso foi elevada devido à manifestação da resistência ao herbicida glyphosate, detectada em lavouras de soja e milho, além de pomares de citros (Melo, 2011; Carvalho et al., 2011; Heap, 2015). Como local alternativo de ação pós-emergência, os herbicidas inibidores do grupo A/1 ou da acetilCoA carboxilase (ACCCase) têm sido amplamente utilizados para controlar a *D. insularis* resistente a glyphosate nos campos de soja da América do Sul (Gemelli et al., 2012; Takano et al., 2020).

A acetil-CoA carboxilase (ACCCase) é uma enzima ubíqua que, na dependência de biotina, catalisa duas reações irreversíveis, comprometendo a via de síntese de ácidos graxos (Christoffoleti et al., 2016). Os herbicidas inibidores de ACCCase foram introduzidos na agricultura a partir de 1978 (Powles et al., 2010) e são utilizados no controle de plantas daninhas gramíneas, em condições de pós-emergência, em culturas dicotiledôneas (Kukorelli et al., 2013)

Em 2016, na região Centro Oeste do país, foi registrado resistência de capim-amargoso aos herbicidas inibidores da ACCCase, como fenoxaprop e haloxifop (Heap, 2020). Mais recentemente, foi relatado biótipo resistente, no estado do Mato Grosso, resistente ao haloxifop e pinoxadem (Takano et al., 2020).

A resistência de plantas daninhas a herbicidas representa um problema crescente, afetando diretamente a produtividade agrícola e a sustentabilidade dos

sistemas de cultivo. Problemas relacionados ao manejo inadequado, como o uso repetitivo de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação, têm favorecido a seleção de biótipos resistentes de *Digitaria insularis*. Essa seleção resulta na diminuição da eficácia dos compostos químicos disponíveis e no aumento da infestação da espécie nas áreas agrícolas. Diante desse cenário, o presente estudo tem como objetivo validar um teste de PCR aliado ao sequenciamento, visando o monitoramento de mutações no gene da enzima acetil-CoA carboxilase (ACCase) em genótipos de capim-amargoso.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Digitaria insularis*

O Brasil é o país com maior diversidade de espécies do gênero *Digitaria sp.*, sendo constatada a presença de 26 espécies nativas e de 12 exóticas. Entre estas espécies, atualmente, uma das que apresenta ampla distribuição geográfica é a *Digitaria insularis* (capim amargoso)(Figura 1), ocorrendo na maioria dos ambientes favoráveis à agricultura, desde o continente asiático ao americano (Mondo et al., 2010).

Nas últimas décadas, principalmente após o advento do sistema de plantio direto, esta espécie vem apresentando maior relevância dentro da agricultura brasileira, sendo este aumento de ocorrência relacionado às suas características de agressividade. Entre elas destaca-se a capacidade de formação de rizomas, que apesar de curtos são bem evidentes, formando notáveis touceiras (Clayton et al., 2006) e a capacidade de disseminação de propágulos (sementes) praticamente durante todo o verão (Kissmann; Groth, 1997; Lorenzi, 1984). As sementes desta espécie são revestidas por muitos pêlos, os quais auxiliam sua dispersão a longas distâncias, o que, aliado ao grande percentual germinativo, permite que essa planta se dissemine com grande facilidade (Kissmann; Groth, 1997). Plantas jovens, provenientes de sementes, são mais facilmente controladas com o uso de herbicidas. Porém, plantas adultas com touceiras perenizadas e presença de rizomas, têm seu controle dificultado (Machado et al., 2008; Timossi et al., 2009; Gemelli et al., 2012).

A repetida utilização dos herbicidas com o mesmo mecanismo de ação, nos últimos anos, tem causado a pressão de seleção em algumas espécies de plantas daninhas, com conseqüente surgimento de populações resistentes. Em 2016, na região Centro Oeste do país, foi registrado resistência de capim-amargoso aos herbicidas inibidores da ACCase, como fenoxaprop e haloxyfop (Heap, 2020). Mais recentemente, foi relatado biótipo resistente, no estado do Mato Grosso, resistente ao haloxyfop e pinoxadem (Takano et al., 2020).

Figura 1: Capim- Amargoso



Fonte: Do autor

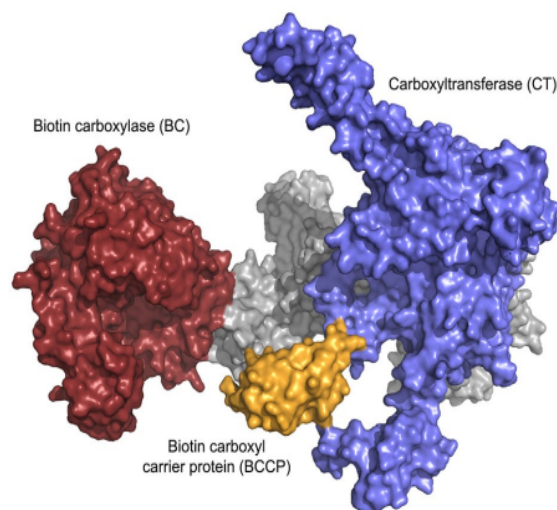
2.2 Herbicidas inibidores da Acetil-CoA carboxilase

Nas últimas duas décadas, os herbicidas inibidores da enzima acetil-CoA carboxilase (ACCase) têm assumido grande importância, por possibilitarem o controle seletivo em pós-emergência de espécies da família Poaceae em culturas dicotiledôneas e, em alguns casos, também em culturas monocotiledôneas (Kuk et al., 2000).

A ACCase é uma enzima ubíqua que, na dependência de biotina, catalisa duas reações irreversíveis que determinam o comprometimento da via de síntese de ácidos graxos (Christoffoleti et al., 2016). Esses herbicidas bloqueiam a biossíntese de ácidos graxos, impossibilitando a formação de lipídios e metabólitos secundários nas plantas suscetíveis. Como resultado, a integridade da membrana celular é afetada, acarretando no extravasamento de metabólitos intracelulares, e morte celular (Délye, 2005; Kaundun, 2014).

A enzima é composta por três domínios funcionais: proteína transportadora biotina-carboxila (BCCP), biotina carboxilase (BC) e carboxiltransferase (CT) (Ohlrogge; Browse, 1995) (Figura 2). Na maioria dos casos, mutações pontuais em um desses domínios podem conferir resistência a esses herbicidas. Resíduos Ile1781, Trp1999, Trp2027, Ile2041, Asp2078, Cys2088 e Gly2096, presentes no domínio CT da ACCase plastídica têm sido associados à resistência cruzada aos herbicidas ACCase em várias espécies de ervas daninhas gramíneas (Beckie; Tardif, 2012; Délye, 2005; Kaundun, 2014; Liu et al., 2007; Powles; Yu, 2010; Takano et al., 2020).

Figura 2: Estrutura terciária da enzima ACCase e seus domínios: proteína transportadora biotina-carboxila (BCCP), biotina carboxilase (BC) e carboxil transferase (CT).



Fonte: Takano et al. (2020)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a eficiência de um teste de PCR aliado ao sequenciamento de DNA para o monitoramento de mutações no gene da ACCase em plantas de capim-amargoso (*D. insularis*), relacionando os resultados moleculares com dados de campo sobre resistência ou suscetibilidade a herbicidas inibidores da ACCase.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a extração do DNA.
- Amplificar regiões específicas do DNA por meio da técnica de PCR utilizando primers apropriados.
- Purificar os produtos amplificados da PCR.
- Submeter os produtos amplificados ao sequenciamento.
- Realizar o alinhamento das sequências obtidas e identificar seis mutações específicas associadas à resistência ou susceptibilidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal e Crescimento

Sementes de *D. insularis* com suposta resistência a Inibidores de Accase foram coletadas em campo em Primavera Leste (MT), Araguari (MG), Amambaí (MS), Chapadão do Sul (MS) e Chapadão do Céu (GO).

Os biótipos de capim amargoso foram semeados em bandejas com adubo comercial e mantidas em estufa localizada na Estação de Pesquisa da Bayer em Paulínia, após a germinação foram transplantadas em vasos individuais e armazenadas em casa de vegetação com regime de irrigação de 5 minutos de manhã e na parte da tarde. Após o crescimento (Figura 3), as plantas foram submetidas a um bioensaio de curva de dose-resposta, para as populações de *D. insularis* o tratamento de herbicida foi constituído de 7 doses de Haloxifop: 480, 240, 120, 60, 30, 15, 7.5 g i a ha⁻¹, e avaliadas no intervalo de 7, 14 e 28 após a aplicação (DAA). Das plantas sobreviventes, folhas jovens foram coletadas como material biológico, estocadas em tubo eppendorf® de 1,5 ml ® e em seguida foram

armazenadas em um freezer à temperatura de -80°C para posterior extração do material genético. As amostras suscetíveis utilizadas como controle encontram-se disponíveis no banco de dados da Bayer, na mesma estação experimental.

Figura 3: Plantas de *D. insularis* analisadas



Fonte: Base de dados da pesquisa.

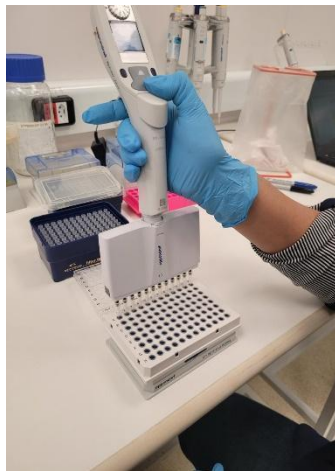
4.2 Amplificação do gene ACCase

O DNA genômico foi extraído de 18 plantas com suposta resistência e 6 plantas suscetíveis. O tecido foliar (50 mg) foi triturado com a ajuda de nitrogênio líquido e beads, sempre mantendo as amostras resfriadas evitando a ação das nucleases e destruição de material genético. Ao final da trituração foi utilizado o kit DNeasy® Plant Mini Kit para extração do DNA conforme orientação do fabricante. Após a extração do DNA, foi utilizado o espectrofotômetro (NanoDrop® 2000C) para quantificação da concentração do ácido nucleico e sua pureza.

Um par de iniciadores universais da ACCase previamente relatados em TAKANO et al., (2020) foram utilizados para amplificar a sequência do gene ACCase em *D. insularis*: ACCase F2 (5'-CAGCCTGATTCCCACGAGCGGTCTGTTCCCTCGTCCAGGGCAAGTTTG-3'), e ACCase R2 (5'-CCATGCAITCTTIGAGITCCTCTGA-3'). O PCR foi realizado em volume final de 12,5 μL utilizando Kit Promega com Master Mix de 10,5 μL e 2,0 μL

de molde de DNA a $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. As configurações de ciclagem de PCR foram: um ciclo a 94°C por 4 min, 35 ciclos a 94°C por 30 s, 58°C por 30 s, 72°C por 60 s, e extensão final a 72°C por 7 min. A base I se refere desoxiinosina que possui a capacidade de parear com todas as quatro bases; entretanto ela apresenta afinidades variadas. Ordem da estabilidade para as diferentes combinações da mais estável para menos estável relatada por Martin et al: I:C, I:A, I:T, e I:C. O par I:C foi relatado como levemente menos estável que o par I:A. (Martin et al., 1985).

Figura 4: Montagem da reação de PCR



Fonte: Base de dados da pesquisa.

4.3 Alinhamento do gene ACCase

Após a amplificação, as amostras foram enviadas ao Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) localizado na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) para sequenciamento, utilizando o método de Sequenciamento Sanger. Os resultados do sequenciamento foram analisados com a ajuda do Software Genomics Workbench Premium e compararam-se os biótipos suscetíveis e resistentes

As mutações analisadas neste estudo foram Ile1781, Trp1999, Trp2027, Ile2041, Asp2078 e Cys2088, previamente descritas por Takano et al. (2020). O método de análise adotado seguiu os procedimentos estabelecidos por essa pesquisa, permitindo a comparação direta dos resultados obtidos com os dados já existentes na literatura.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2 Amplificação e alinhamento dos produtos de PCR contendo sequência do gene que codifica ACCase

Com base nos resultados apresentados por Takano et al.(2020), na Figura 3 de seu trabalho, observa-se que a principal mutação ocorre no terceiro nucleotídeo do códon correspondente ao aminoácido na posição 2027. Na sequência da ACCase da população resistente de *Digitaria insularis*, foi identificada a substituição de uma guanina por uma citosina na terceira posição do códon. Essa alteração resulta na troca do aminoácido triptofano (Trp) por cisteína (Cys), na posição 2027 (Trp2027Cys), caracterizando uma mutação associada à resistência.

Figura 3: Alinhamento de sequências de genes ACCase.

```

                                     Trp1999
S. -----CACGAGCGGTCTGTTCCCTCGTCCAGGGCAAGTTTGGTTTCCAGATT
R. -----CACGAGCGGTCTGTTCCCTCGTCCAGGGCAAGTTTGGTTTCCAGATT
*****

S. CTGCAACCAAGACAGCTCAGGCATTGTTGGATTTCAACCGTGAAGGGTTGCCTCTCTTCA
R. CTGCAACCAAGACAGCTCAGGCATTGTTGGATTTCAACCGTGAAGGGTTGCCTCTCTTCA
*****

          Trp2027Cys                                Ile2041
S. TCCTTGCTAACTTGGAGAGGTTTCTCCGGTGGACAAAGAGATCTGTTTGAAGGAATTCTTC
R. TCCTTGCTAACTTGCAGAGGTTTCTCCGGTGGACAAAGAGATCTGTTTGAAGGAATTCTTC
*****

S. AGGCTGGGTCAACAATTGTTGAGAACCCTTAGGACATACAATCAGCCTGCGTTTGTCTACA
R. AGGCTGGGTCAACAATTGTTGAGAACCCTTAGGACATACAATCAGCCTGCGTTTGTCTACA
*****

                                     Asp2078
S. TTCCTATGGCTGGAGAGCTGCGCGGAGGAGCTTGGGTTGTGGTTGATAGCAAAATAAATC
R. TTCCTATGGCTGGAGAGCTGCGCGGAGGAGCTTGGGTTGTGGTTGATAGCAAAATAAATC
*****

          Cys2078                                Gly2096
S. CAGACCGCATTGAGTGTTATGCTGAGAGGACTGCAAAAGGCAATGTC-----
R. CAGACCGCATTGAGTGTTATGCTGAGAGGACTGCAAAAGGCAATGTC-----
*****

```

Fonte: Takano et al. (2020).

Após a amplificação por PCR e o subsequente alinhamento dos fragmentos de DNA, foi elaborada uma tabela que reúne as amostras analisadas e as respectivas mutações observadas. Na tabela, as amostras marcadas com "S"

indicam suscetibilidade, aquelas com "H" indicam heterozigose para a mutação analisada, e as com "R" indicam resistência. As amostras numeradas de 1 a 6 correspondem aos controles suscetíveis utilizados como referência, enquanto as amostras 7 a 24 referem-se às plantas suspeitas de apresentarem resistência aos herbicidas inibidores de ACCase.

Foram analisadas seis mutações pontuais previamente descritas na literatura como associadas à resistência a herbicidas inibidores da ACCase em espécies de plantas daninhas. A mutação Trp1999Cys resulta da substituição do códon TGG por TGT ou TGC, promovendo a troca do aminoácido triptofano por cisteína. A mutação Trp2027Cys é caracterizada pela alteração do códon TGG para TGT ou TGC, ocasionando igualmente a substituição de triptofano por cisteína. No caso da mutação Ile2041Asn, observa-se a substituição do códon ATN (onde N representa qualquer nucleotídeo) por AAT ou AAC, resultando na troca da isoleucina por asparagina. A mutação Asp2078Gly envolve a mudança do códon GAT para GGT ou GGC, levando à substituição do ácido aspártico por glicina. A mutação Cys2088Phe decorre da troca do códon TGC por TTC ou TTT por TTC, ocasionando a substituição do aminoácido cisteína por fenilalanina. Por fim, o sítio Gly2096 refere-se a possíveis alterações no códon GGN, que codifica glicina. Essas alterações são conhecidas por modificar a conformação da enzima ACCase, reduzindo a afinidade dos herbicidas pelo sítio-alvo e conferindo resistência aos compostos inibidores.

Dentre as seis mutações analisadas, apenas a mutação Trp2027Cys foi identificada nas amostras avaliadas. As amostras 13, 14, 17, 19, 21, 22 e 23 apresentaram-se heterozigotas para essa mutação, conforme determinado por Sequenciamento Sanger. Entre as 18 amostras suspeitas de resistência, apenas a amostra 24 foi homozigota para a mutação Trp2027Cys, caracterizada pela substituição do códon TGG por TGT ou TGC, sendo proveniente de Primavera do Leste (MT).

Esta alteração foi associada à resistência aos herbicidas inibidores de ACCase, conforme descrito anteriormente por Takano et al. (2020), o qual relatou que todas as plantas da população suscetível eram homozigotas para o alelo suscetível (TGG/TGG), enquanto plantas resistentes eram homozigotas para o alelo mutado (TGC/TGC). Os resultados obtidos neste estudo corroboram essas

observações, além de identificar oito amostras heterozigotas para a mutação, ou seja, indivíduos que possuem simultaneamente um alelo suscetível e um alelo resistente.

Tabela 1: Análise genotípica de amostras de *Digitaria insularis* quanto à resistência a herbicidas inibidores de ACCase. s = plantas suscetíveis; h = plantas heterozigotas; r = plantas resistentes.

Amostra	Trp1999Cys (TGG -> TGT/C)	Trp2027Cys (TGG->TGT/C)	Ile2041Asn (ATn->AAT/C)	Asp2078Gly (GTA->GGn)	Cys/Phe2088 (TGC/T ou TTT/C)	Gly2096 (GGn->GCn)	Localidade
1	s	s	s	s	s	s	Banco de dados
b	s	s	s	s	s	s	Banco de dados
3	s	s	s	s	s	s	Banco de dados
4	s	s	s	s	s	s	Banco de dados
5	s	s	s	s	s	s	Banco de dados
6	s	s	s	s	s	s	Banco de dados
7	s	s	s	s	s	s	Araguari - MG
8	s	s	s	s	s	s	Araguari - MG
9	s	s	s	s	s	s	Araguari - MG
10	s	s	s	s	s	s	Amambaí - MS
11	s	s	s	s	s	s	Amambaí - MS
12	s	s	s	s	s	s	Amambaí - MS
13	s	h	s	s	s	s	Chapadão do Sul - MS

Tabela 1 (continuação)							
14	s	h	s	s	s	s	Chapadão do Sul - MS
15	s	s	s	s	s	s	Chapadão do Sul - MS
16	s	s	s	s	s	s	Chapadão do Céu - GO
17	s	h	s	s	s	s	Chapadão do Céu - GO
18	s	s	s	s	s	s	Chapadão do Céu - GO
19	s	h	s	s	s	s	Primavera do Leste -MT
20	s	h	s	s	s	s	Primavera do Leste -MT
21	s	h	s	s	s	s	Primavera do Leste -MT
22	s	h	s	s	s	s	Primavera do Leste -MT
23	s	h	s	s	s	s	Primavera do Leste -MT
24	s	r	s	s	s	s	Primavera do Leste -MT

Esses achados reforçam a importância da detecção molecular de mutações associadas à resistência para o desenvolvimento de estratégias de manejo mais eficientes e sustentáveis para populações de *D. insularis*.

6. CONCLUSÕES

A análise molecular realizada neste estudo permitiu a identificação da mutação Trp2027Cys em uma amostra de *Digitaria insularis* com suspeita de resistência a herbicidas inibidores da ACCase. Essa mutação, já descrita por Takano et al. (2020) como responsável pela resistência a esse grupo de herbicidas, foi encontrada de forma homozigota na amostra 24, enquanto outras sete amostras apresentaram-se heterozigotas. Esses resultados indicam que, embora a resistência associada a essa mutação ainda não esteja amplamente disseminada na população avaliada, há um potencial significativo para sua propagação.

A presença de indivíduos heterozigotos na população é um fator de preocupação, especialmente considerando a alta capacidade reprodutiva de *D. insularis*. O cruzamento entre plantas heterozigotas pode rapidamente gerar descendentes homozigotos para a mutação de resistência, favorecendo a disseminação de biótipos resistentes nas áreas agrícolas.

O teste de PCR seguido de sequenciamento mostrou-se uma ferramenta confiável e eficiente na identificação de mutações no gene da ACCase, permitindo a correlação dos dados moleculares com as informações de resistência observadas em campo.

Diante dos resultados, reforça-se a necessidade de adotar práticas de manejo integrado de plantas daninhas, que envolvam o monitoramento de biótipos resistentes, a rotação de culturas e a rotação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação. Além disso, práticas culturais e mecânicas que promovam a diversificação das estratégias de controle de plantas invasoras devem ser incentivadas, a fim de retardar a evolução e disseminação da resistência e garantir a sustentabilidade dos sistemas produtivos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BECKIE, H. J.; TARDIF, François J. Herbicide cross resistance in weeds. **Crop Protection**, v. 35, p. 15-28, 2012.

CARVALHO, L.B. et al. Detection of sourgrass (*Digitaria insularis*) biotypes resistant to glyphosate in Brazil. **Weed Science**, v.59, n.2, p.171-176, 2011.

CHRISTOFFOLETI, P.J. (Coord.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 4.ed. Piracicaba: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas Daninhas aos Herbicidas (HRAC-BR), 120 p, 2016.

CLAYTON, W. D. et al. Grass Base - **The Online World Grass Flora**, 2006.
Disponível em: <<http://www.kew.org/data/grasses-db.html>>.

DÉLYE, Christophe. Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: an update. **Weed Science**, v. 53, n. 5, p. 728-746, 2005.

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

HEAP, I.M. **International survey of herbicide-resistant weeds**. Disponível em: <www.weedscience.org>. Acesso em: 5 out. 2015.

HEAP, I. The international survey of herbicide resistant weeds. **WeedScience**. org. v. 25, p. 2020.

KAUNDUN, S. S. Resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1405-1417, 2014.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2.ed. São Paulo: BASF, 1997. Tomo I. 825 p.

KUK, Y.I.; BURGOS, N.R.; TALBERT, R.E. Cross and multiple resistance of diclofop-resistant *Lolium* spp. **Weed Science**, v. 48, n. 4, p.412-419, 2000.

KUKORELLI, G.; REISINGER, P.; PINKE, G. ACCase inhibitor herbicides—selectivity, weed resistance and fitness cost: a review. **International journal of pest management**, v. 59, n. 3, p. 165-173, 2013.

LIU, W. et al. Single-site mutations in the carboxyltransferase domain of plastid acetyl-CoA carboxylase confer resistance to grass-specific herbicides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 9, p. 3627-3632, 2007.

LORENZI, M. Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional. **Nova Odessa, edição do autor**, 1984.

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

MARTIN, F. H. et al. Base pairing involving deoxyinosine: implications for probe design. **Nucleic acids research**, v. 13, n. 24, p. 8927-8938, 1985.

MELO, M.S.C. **Alternativas de controle, acúmulo de chiquimato e curva de crescimento de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) suscetível e resistente ao glyphosate**. 2011. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

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, p. 131-137, 2010.

OHLROGGE, John; BROWSE, John. Lipid biosynthesis. **The plant cell**, v. 7, n. 7, p. 957, 1995.

POWLES, Stephen B.; YU, Qin. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual review of plant biology**, v. 61, n. 1, p. 317-347, 2010.

Takano HK, Melo MSC, Ovejero RFL, Westra PH, Gaines TA, Dayan FE. Trp2027Cys mutation evolves in *Digitaria insularis* with cross-resistance to ACCase inhibitors. **Pestic Biochem Physiol**. 2020 Mar;164:1-6

TAKANO, H. K. et al.. ACCase-inhibiting herbicides: mechanism of action, resistance evolution and stewardship. **Scientia Agricola**, v. 78, n. 1, p. e20190102, 2021.

TIMOSSI, P. C. et al. Manejo de rebrotes de *Digitaria insularis* (L.) Fedde no plantio direto de milho. **Planta Daninha**, v.27, n.1, p.175- 179, 2009.