

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MORFOFISIOLÓGICA DE
POPULAÇÕES DE BUVA (*Conyza spp.*) RESISTENTES AO
GLYPHOSATE**

GIOVANNA LARISSA GIMENES COTRICK GOMES

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Agricultura)

BOTUCATU – SP

Dezembro – 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MORFOFISIOLÓGICA DE
POPULAÇÕES DE BUVA (*Conyza spp.*) RESISTENTES AO
GLYPHOSATE**

GIOVANNA LARISSA GIMENES COTRICK GOMES

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Agricultura)

BOTUCATU – SP
Dezembro - 2014

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

G633c Gomes, Giovanna Larissa Gimenes Cotrick, 1985-
Caracterização bioquímica e morfofisiológica de populações de buva (*Conyza* spp.) resistentes ao glyphosate / Giovanna Larissa Gimenes Cotrick Gomes. - Botucatu : [s.n.], 2014
vi, 112 f. : ils. color., grafs., tabs., fots. color.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2014
Orientador: Edivaldo Domingues Velini
Inclui bibliografia

1. Resistência a herbicidas. 2. Plantas - Efeito dos herbicidas. 4. Plantas - Metabolismo. I. Velini, Edivaldo Domingues. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MORFOFISIOLÓGICA DE
POPULAÇÕES DE BUVA (*Conyza* spp.) RESISTENTES AO
GLYPHOSATE"

ALUNA: GIOVANNA LARISSA GIMENES COTRICK GOMES

ORIENTADOR: PROF. DR. EDIVALDO DOMINGUES VELINI

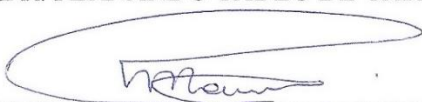
Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. EDIVALDO DOMINGUES VELINI



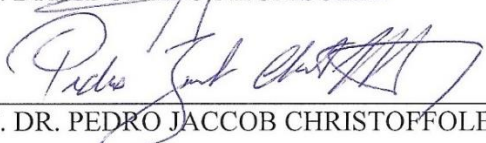
PROF. DR. FERNANDO TADEU DE CARVALHO



PROF. DR. FERNANDO STORNILO ADEGAS



PROF. DR. EDUARDO NEGRISOLI



PROF. DR. PEDRO JACCOB CHRISTOFFOLETI

Data da Realização: 12 de dezembro de 2.014.

Aos meus avós Doraci (in memoriam) e Vivaldo (in memoriam),

pelo amor que sempre dispensaram

e por serem meus grandes exemplos de família.

DEDICO

Ao meu esposo Caio,

*pela compreensão, amor, apoio,
confiança e companheirismo em todos os
momentos.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e mais esta importante vitória.

Ao Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini, pela orientação, amizade e dedicação dispensada durante todo o período de estágio, mestrado e doutorado, e por ter grande parcela na minha formação pessoal e profissional.

Ao meu esposo e companheiro Caio Antonio Carbonari, pelo amor e amizade, pela indispensável ajuda, por compartilhar todos os momentos e ser a pessoa que ilumina a minha vida.

Aos meus pais Ivan Alexandre Cotrick Gomes e Ieda Regina Gimenes por todo amor, carinho, incentivo e ensinamentos.

Às minhas queridas irmãs Julianna Leticia Gimenes Cotrick Gomes e Lucianna Laiz Gimenes Cotrick Gomes, por serem minhas grandes amigas.

Aos meus avós, Dora (*in memoriam*) e Vadico (*in memoriam*), por absolutamente tudo, e por serem grandes responsáveis por mais esta conquista, tenho absoluta certeza que onde quer que eles estejam estarão muito orgulhosos.

Aos meus queridos sogra e sogro que hoje considero como meus pais também, Elisabete Angela Cavalli Carbonari e Alvair Antonio Carbonari por todo amor, amizade e apoio.

À Dra. Maria Lúcia Bueno Trindade, pela amizade por toda a ajuda em muitos momentos durante a pós graduação.

Aos amigos Rosilaine Araldi, Marcelo Giroto, Ilca Puertas Freitas e Silva, Leandro Tropaldi, Natália Corniani, Gilmar José Picoli Junior, Ana Karollyna Alves de Matos, Gabrielle de Castro Macedo, Bruna Marchesi, Débora de Oliveira Latorre, Plínio Saulo Simões, Edicarlos Batista de Castro, Renan Fonseca Nascentes e Ronei Ben pelos bons momentos de convívio e valiosas colaborações durante o período do curso de pós-graduação.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal, José Roberto Marques Silva, José Guilherme Cordeiro, Luis Marcelo Siono e Thiago Marcelo Ribeiro Gianeti pelas preciosas colaborações durante a realização dos experimentos e análises laboratoriais.

Ao Dr. Stephen O. Duke e ao Dr. Franck Dayan pela orientação e ensinamentos durante o período de doutorado sanduíche nos Estados Unidos no “Natural Products Research Unit” (USDA).

A todos os amigos da Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais (FEPAF), em especial à Silvia Regina Soler e Patricia Carnietto Nunes.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia / Agricultura, e à Faculdade de Ciências Agronômicas, pela oportunidade e formação.

A CAPES, pela bolsa de estudos concedida durante o período de doutorado e pela bolsa para realização do doutorado sanduíche no exterior.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram na realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
1 RESUMO	1
2 SUMMARY	3
3 INTRODUÇÃO	5
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
4.1 Glyphosate: características e modo de ação	8
4.2. Resistência de plantas daninhas a herbicidas	16
4.3. Resistência de plantas daninhas ao glyphosate	19
4.4. Confirmação da resistência de plantas daninhas a herbicidas	23
4.5. Aspectos da biologia de <i>Conyza</i> spp.	26
5 MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1 Estudo preliminar	33
5.2. Estudo 1: Curvas de dose-resposta	36
5.3. Estudo 2: Determinação dos compostos relacionados à rota do ácido chiquímico e ácido abscísico (ABA)	36
5.4 Estudo 3: Avaliação do crescimento e produção de sementes	42
5.5. Análise dos resultados	43
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6.1 Estudo Preliminar	46
6.2. Estudo 1: Curvas de dose-resposta	56
6.3. Estudo 2: Determinação dos compostos relacionados à rota do ácido chiquímico e ácido abscísico (ABA)	60
6.4 Estudo 3: Avaliação do crescimento e produção de sementes	71
6.4.1. Efeitos do glyphosate no crescimento das plantas	71
6.4.2. Efeitos do glyphosate no florescimento e produção de sementes	77
7 CONCLUSÕES	88
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar quatro populações de *Conyza* spp. bioquimicamente e morfofisiologicamente. Os experimentos foram realizados em casa de vegetação com quatro populações (P1, P3 e P4 – *Conyza sumatrensis*; P2 – *Conyza bonariensis*) que foram coletados em diferentes municípios do estado de São Paulo. Os tratamentos foram constituídos da aplicação de doses do herbicida glyphosate: 45, 90, 180, 360, 720, 1440, 2880, 5760 e 11520 g e.a. ha⁻¹; e uma testemunha sem aplicação. No momento da aplicação as plantas apresentavam de 5 a 6 folhas totalmente expandidas. Foi realizado um estudo preliminar e mais três estudos, com os mesmos tratamentos, mas com avaliações distintas. O estudo preliminar foi composto de um experimento com a população 4, onde foram avaliados aos 28 dias após os tratamentos (DAT) a altura das plantas, porcentagem de controle, massa fresca de parte aérea, e quantificação dos seguintes compostos por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas (LC-MS/MS): glyphosate, ácido aminometilfosfônico (AMPA), ácido chiquímico, ácido desidrochiquímico, fenilalanina, tirosina, triptofano, e ácido salicílico. No primeiro estudo foram realizadas as curvas de dose resposta para as quatro populações testadas. No estudo seguinte, aos 14 DAT foi realizada a coleta de todas as folhas de cada planta (repetição) para quantificação dos mesmos compostos já descritos no estudo preliminar, além do ácido indolacético (IAA) e ácido abscísico (ABA) por LC-MS/MS. O último estudo teve como objetivo avaliar o crescimento, florescimento e produção de sementes, por meio de avaliações de altura, número de brotações laterais, número de capítulos abertos e número

total de capítulos, em diferentes períodos para cada população de acordo com o desenvolvimento de cada uma. As três populações de *C. sumatrensis* (P1, P3 e P4) apresentaram resistência ao glyphosate e a população 2 de *C. bonariensis* mostrou-se suscetível ao herbicida. Os níveis de glyphosate e AMPA, bem como de ácido chiquímico e desidrochiquímico nas plantas foram inversamente proporcionais ao nível de resistência dos diferentes biótipos, e mostraram-se eficientes indicadores da intoxicação das plantas suscetíveis. Os níveis de fenilalanina e tirosina apresentaram comportamento semelhante em todas as populações, com aumento da concentração destes aminoácidos nas folhas expostas às maiores doses de glyphosate nas populações resistentes e o triptofano foi menos sensível à presença do glyphosate nas populações resistentes, enquanto que o aumento dos níveis do mesmo ocorreu principalmente na população suscetível. As populações resistentes (1 e 3) apresentaram aumentos nos níveis de ácido salicílico, enquanto houve queda dos níveis desse composto na população suscetível. Os níveis de ácido indolacético e ácido abscísico aumentaram nas plantas submetidas às maiores doses de glyphosate. As populações resistentes apresentaram aumento na altura das plantas nas doses de 45, 90 e 180 g ha⁻¹ de glyphosate e maior desenvolvimento de brotações laterais nas doses mais elevadas. Ocorreu antecipação do florescimento e aumento do número total de capítulos e de capítulos abertos na população 1 nas plantas que receberam a aplicação de glyphosate nas doses de 180 e 360 g ha⁻¹; na população 3 nas doses de 90 e 180 g ha⁻¹ e na população 4 (experimento em temperaturas mais elevadas) nas doses de 90, 180 e 360 g ha⁻¹. Não ocorreu antecipação de florescimento e aumento na produção de sementes para a população 2 (suscetível) e população 4 no experimento com temperaturas mais amenas e menor nível de resistência.

2 SUMMARY

BIOCHEMICAL AND MORPHOPHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF POPULATIONS OF HORSEWEED (*CONYZA* SPP.) GLYPHOSATE RESISTANT

Botucatu, 2014, 114p. Tese (Doutorado em Agronomia / Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: GIOVANNA LARISSA GIMENES COTRICK GOMES

Adviser: Dr. EDIVALDO DOMINGUES VELINI

The objective of this research was to characterize four *Conyza* spp. populations biochemically and morphophysiologically. The experiments were carried out in a greenhouse with four populations (P 1, 3 and 4 - *Conyza sumatrensis*; P 2 - *Conyza bonariensis*). Seeds were collected in different municipalities of the Sao Paulo state. The treatments consisted of the glyphosate application in different doses: 45, 90, 180, 360, 720, 1440, 2880, 5760 and 11520 g ae ha⁻¹ and one untreated control. The herbicide glyphosate was applied to plants with 5-6 expanded leaves. Were performed a preliminary study and three others studies, with the same treatments but with different evaluations. The preliminary study consisted of an experiment with population 4, which was evaluated at 28 days after treatment (DAT) the plant height, percentage of control, fresh weight of plants, and quantitation of glyphosate, aminomethylphosphonic acid (AMPA), shikimic acid, dehydroshikimic acid, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, and salicylic acid by LC-MS/MS. In the first study, the dose response curves were performed. In the following study, at 14 DAT, all the leaves of each plant were

harvested for quantitation of the compounds already described in the preliminary study and abscisic acid and indoleacetic acid by LC-MS/MS. The latest study was evaluated the growth, flowering and seed production, through assessments of height, number of lateral buds, number of opened flowers (with seeds) and total number of flowers in different periods for each population according to the development of each. The three populations of *C. sumatrensis* (Bio 1, 3 and 4) exhibited resistance to glyphosate and *C. bonariensis* population 2 was susceptible to the herbicide. Levels of glyphosate, AMPA, shikimic acid and dehydroshikimic acid were inversely proportional to the resistance of different populations, and were effective indicators of plant intoxication. The levels of phenylalanine and tyrosine were similar in all populations, with an increase in concentration of these aminoacids in the glyphosate resistant biotypes exposed to larger doses of glyphosate and the tryptophan was less sensitive to the presence of the glyphosate in the resistant populations, while occurred an important increase in the levels in the susceptible population. The resistant populations (1 and 3) showed increase in the levels of salicylic acid, while there was a decrease in the levels of this compound in the susceptible population. The levels of indole acetic acid and abscisic acid increased in plants subjected to higher doses of glyphosate. The glyphosate-resistant populations showed an increase in plant height at doses of 45, 90 and 180 g ha⁻¹ and further development of lateral buds at the higher doses. Occurred anticipation of flowering and increase the total number of flowers and open flowers in the glyphosate-resistant population 1 after the application of 180 and 360 g ha⁻¹; in the glyphosate-resistant population 3 at doses of 90 and 180 g ha⁻¹ and glyphosate-resistant population 4 (experiment at higher temperatures) at doses of 90, 180 and 360 g ha⁻¹. There was no anticipation of flowering and increased seed production for population 2 (susceptible) and population 4 (experiment with milder temperatures and less resistance level)

Keywords: flowering, shikimic acid, dehydroshikimic acid, aromatic aminoacids, glyphosate-resistance.

3 INTRODUÇÃO

O glyphosate é o herbicida mais utilizado no mundo para o controle de plantas daninhas mono e dicotiledôneas em pós emergência, e tem como mecanismo de ação a inibição da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) com consequente interrupção da rota do ácido chiquímico, que é responsável pela produção dos três aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano (FRANZ et al., 1997). Os aminoácidos aromáticos são precursores de muitos metabólitos secundários, como pigmentos, flavonóides, auxinas (ácido indolacético), fitoalexinas, lignina e taninos, sendo assim, as plantas submetidas ao glyphosate podem ter a síntese desses compostos também alterada.

As plantas expostas de alguma maneira ao glyphosate, seja por aplicação do herbicida, ou pela deriva, podem sofrer uma série de alterações metabólicas, sendo que uma das mais proeminentes e estudadas é o acúmulo do ácido chiquímico pelas plantas. São inúmeros os trabalhos que estudam o acúmulo deste composto em diversas espécies de plantas, decorrente da aplicação de diferentes doses do herbicida, podendo inclusive ser utilizado como um bioindicador para a intoxicação das plantas sensíveis ao herbicida, pois nas plantas resistentes, com a EPSPS insensível ao glyphosate, não ocorre esse aumento nos níveis de ácido chiquímico. Além do acúmulo do ácido chiquímico, pode ocorrer o acúmulo de ácidos hidroxibenzóicos, como o protocatecuico e o gálico, do ácido quínico, e do ácido desidrochiquímico, que também fazem parte da rota de biossíntese dos aminoácidos aromáticos, na qual o glyphosate atua.

Com o advento das culturas geneticamente modificadas resistentes ao glyphosate, este herbicida passou a ser extensivamente e repetidamente aplicado, causando uma aceleração da seleção e disseminação de plantas daninhas resistentes ao glyphosate, tornando-se um grande problema para a agricultura mundial. A resistência de plantas daninhas a herbicidas é um processo evolutivo, sendo definida como a capacidade inerente e herdável de alguns biótipos, dentro de uma determinada população, de sobreviver e se reproduzir após a exposição a uma dose de herbicida, que normalmente seria letal a uma população suscetível da mesma espécie (Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas aos Herbicidas HRAC-BR). Atualmente estão registrados 434 casos de resistência de plantas daninhas a herbicidas no mundo, com 237 espécies em 22 dos 25 mecanismos de ação de herbicidas conhecidos e sendo 29 destas espécies resistentes ao glyphosate e (HEAP, 2014a).

A maneira mais comum para confirmação da resistência de plantas daninhas a herbicidas é a realização de um ensaio clássico, que inicia-se com a coleta de sementes em áreas suspeitas e a condução de um experimento de dose-resposta, que permite a visualização da magnitude da resistência, através dos resultados de controle entre o biótipo resistente e o suscetível. Ensaio com a detecção de bioindicadores também são realizados, como por exemplo o acúmulo ou não do ácido chiquímico em plantas e discos de folhas para detecção da resistência em um período muito menor do que o ensaio clássico.

Algumas das plantas daninhas resistentes de maior ocorrência no mundo são do gênero *Conyza* spp., sendo que as três principais espécies são a *Conyza canadensis*, a *C. bonariensis* e a *C. sumatrensis*. Estas espécies possuem como característica a alta produção de sementes, que são facilmente disseminadas pelo vento, aliado a alta diversidade genética, favorecendo o desenvolvimento a seleção das plantas resistentes, uma vez que as mesmas possuem respostas variáveis aos efeitos dos herbicidas. Além disso, as plantas daninhas do gênero *Conyza* possuem alta adaptabilidade ecológica, facilitando a sobrevivência dos biótipos resistentes. A resistência ao glyphosate já foi comprovada em biótipos de *C. bonariensis* e *C. canadensis* no Rio Grande do Sul (VARGAS et al., 2007; LAMEGO e VIDAL, 2008), e de *C. sumatrensis*, no Paraná (SANTOS, 2012). Até hoje, no mundo, foram registrados 12 casos de *C. bonariensis*, 37 de *C. canadensis* e quatro de *C. sumatrensis* resistentes ao glyphosate (HEAP, 2014a).

O principal mecanismo de resistência ao glyphosate em espécies de *Conyza* spp. está relacionado à redução da translocação do produto na planta, que necessita

movimentar-se dentro da mesma para que sua eficácia seja atingida. A redução de translocação é provavelmente devido ao aprisionamento do glyphosate dentro do vacúolo das plantas, através de proteínas presentes no tonoplasto.

Os efeitos do glyphosate na fisiologia e metabolismo das plantas de *Conyza* spp. são bastante estudados, porém, pouco se sabe sobre os efeitos que esse herbicida pode causar na fenologia das plantas suscetíveis e resistentes. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar morfofisiologicamente e bioquimicamente quatro biótipos do gênero *Conyza* spp., sendo três da espécie *Conyza sumatrensis* e um da espécie *Conyza bonariensis*.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Glyphosate: características e modo de ação

O glyphosate é o único herbicida comercial que bloqueia a 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) e possui amplo espectro de controle. Este herbicida possui um amplo conjunto de características favoráveis que o tornam seguro do ponto de vista toxicológico e ambiental, e eficaz no controle de plantas daninhas. Anteriormente ao desenvolvimento da resistência, por seleção natural ou transgenia, praticamente todas as espécies de plantas podem ser consideradas sensíveis ao glyphosate, em maior ou menor grau (VELINI et al., 2012b).

Sua eficácia é dependente da retenção da molécula na superfície foliar, da penetração na folha, da translocação na planta até o sítio de ação e da inibição da EPSPS (KIRKWOOD e MCKAY, 1994). Caseley e Coupland (1985) indicam que o glyphosate segue a mesma rota dos produtos da fotossíntese, indo das folhas fotossinteticamente ativas em direção às partes das plantas que utilizam estes produtos, estabelecendo-se uma relação fonte-dreno.

O glyphosate é muito pouco solúvel em solventes orgânicos comuns, e bastante solúvel em água, tem um elevado coeficiente de adsorção ao solo ($K_d=61 \text{ g cm}^{-3}$), principalmente aos óxidos de alumínio e ferro, meia vida em torno de 47 dias (CENTENO, 2009) e coeficiente de partição octanol/água muito baixo ($K_{ow}=0.00033$), por isso apresenta baixa mobilidade, com pouca tendência para lixiviação no solo (LINDERS et al., 1994). Apresenta-se como um produto altamente solúvel em água (11600 mg L^{-1} a 25°C),

com baixa pressão de vapor (7.5×10^{-8} mm Hg) e ponto de fusão a $189,9^\circ\text{C}$ (FRANZ et al., 1997).

Assim, o glyphosate combina duas características aparentemente antagônicas: alta solubilidade e elevada sorção no solo. A alta solubilidade contribui para a sua segurança em termos toxicológicos (rapidamente excretado pelas vias urinárias e de difícil acumulação em organismos vivos e cadeias alimentares), mas representaria um grande risco para a contaminação de coleções subterrâneas de água se não estivesse associado à elevada sorção nos solos em geral. Mesmo sendo altamente solúvel, os riscos de contaminações subterrâneas de água são baixos como consequência da forte sorção e da rápida dissipação nos solos (VELINI et al., 2012a).

No momento em que o glyphosate atinge o solo, a tendência é que o mesmo seja sorvido rápida e fortemente à fração coloidal, através de ligações similares às do fosfato inorgânico. Quando o glyphosate encontra-se disponível na solução do solo, é degradado rapidamente pelos microorganismos a AMPA e CO_2 (REGITANO, 2009). Os grupos funcionais do glyphosate, como amina, carboxila e fosforados, podem simultaneamente ligarem-se a íons metálicos formando quelatos, além de serem adsorvidos por óxidos de ferro, ocorrendo a rápida inativação do herbicida em contato com o solo (MCBRIDE, 1994). Muitos estudos tentam explicar os mecanismos de ligação do glyphosate com o solo, como a troca de ligantes com os óxidos de ferro e alumínio e as pontes de hidrogênio formadas entre o glyphosate e as substâncias húmicas do solo (FENG e THOMPSON, 1990; MIANO et al., 1992; PRATA et al., 2000).

A rota preliminar de decomposição do glyphosate no ambiente é a degradação no solo (FRANZ et al., 1997), realizada por uma grande variedade de microorganismos, que usam o produto como fonte de energia e fósforo, através de duas rotas catabólicas, produzindo o ácido aminometilfosfônico (AMPA) como principal metabólito, ou pela clivagem da ligação C-P, por ação da enzima C-Piase, produzindo sarcosina como metabólito intermediário na rota alternativa (FRANZ et al., 1997; DICK e QUINN, 1995). Segundo Cox (1998), o AMPA é mais persistente no solo do que o glyphosate, pois a degradação do AMPA é mais lenta. Gimsing et al. (2004) encontraram correlação positiva entre a mineralização do glyphosate e o tamanho da população de *Pseudomonas* spp. nos solos estudados, sendo que esses microorganismos são os principais controladores da mineralização.

Pouco se sabe sobre a(s) enzima(s) envolvidas na degradação do glyphosate a AMPA em plantas (REDDY et al., 2008). Suspeita-se que o glyphosate pode ser metabolizado pelas plantas por duas rotas semelhantes presentes em microorganismos (FRANZ et al., 1997). Uma delas envolve a clivagem da ligação C-N para produzir AMPA e a outra é a quebra da ligação C-P pela enzima C-Piase para gerar a sarcosina. O AMPA é fitotóxico a algumas espécies de plantas, embora ele seja consideravelmente menos ativo do que o glyphosate (FRANZ et al., 1997; HOAGLAND, 1980). Embora o glyphosate seja minimamente metabolizado pelas plantas (DUKE, 1988), o AMPA foi encontrado como metabólito principal em sementes de canola (*Brassica napus* L.) (CESSNA et al., 2000), em trigo (*Triticum aestivum* L.) (CESSNA et al., 1994), em campos de ervilha (*Pisum sativum* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), linhaça (*Linum usitatissimum* L.) (CESSNA et al., 2002), e soja resistente ao glyphosate tratadas com o herbicida (DUKE et al., 2003). O AMPA também foi encontrado na folhagem de *Agropyrum cristatum* (L.) Gaertn. (CESSNA et al., 1995). Resíduos de AMPA também foram detectados em folhas e sementes de soja resistente ao glyphosate, tratada com o herbicida na dose recomendada, indicando o metabolismo do glyphosate na soja transgênica (ARREGUI et al., 2003).

A detecção do AMPA em folhas, raízes e sementes de várias culturas, inclusive a soja transgênica (resistente ao glyphosate), após a aplicação do glyphosate, sugere que a glyphosate oxidoreductase (GOX) ou um tipo de enzima semelhante, catalisa esta conversão (REDDY et al., 2008). O AMPA é tóxico às plantas de soja, no entanto é menos tóxico do que o glyphosate; e seu modo de ação é aparentemente diferente do glyphosate, pois tanto a soja transgênica, como a convencional são igualmente sensíveis ao AMPA (REDDY et al., 2004). Algumas espécies de leguminosas são mais tolerantes ao glyphosate do que outras, sendo que o baixo nível de tolerância pode ser devido a diferenças na atividade da GOX, com rápida detoxificação do glyphosate (REDDY et al., 2004).

Como estratégia de desintoxicação, o gene *gox* foi isolado de *Ochrobactrum anthropi*, cepa LBAA (HALLAS et al., 1988). Este gene *gox* codifica a enzima GOX, que tem a capacidade de degradar o glyphosate a glioxilato e AMPA (BARRY et al., 1992). Como resultado, a GOX catalisa o metabolismo do glyphosate, reduzindo o montante de glyphosate que pode atingir a enzima alvo EPSPS, e portanto, reduzir a possibilidade de injúria na planta pelo glyphosate (TAN et al., 2006). A GOX tem sido empregada na combinação com a EPSPS insensível ao glyphosate, pois o mecanismo de

desintoxicação sozinho não é suficiente para conferir resistência a doses comerciais do herbicida (DILL, 2005).

O modo de ação de um herbicida corresponde aos eventos que ocorrem desde o seu contato inicial com as plantas, a penetração no apoplasto, reversível e sem gasto de energia; a absorção para o simplasto, irreversível e com gasto energético; a movimentação na planta entre órgãos, tecidos, células e organelas; o metabolismo e outras formas de inativação ou ativação; a interação com o sítio de ação até o desencadeamento de eventos que efetivamente levam as plantas à paralisação do crescimento ou à morte (VELINI et al., 2012b).

A maioria dos herbicidas inibem a síntese de uma proteína ou uma enzima nas plantas (COLE et al., 2000). Os herbicidas inibidores de aminoácidos inibem uma enzima da planta e conseqüentemente bloqueiam a biossíntese dos blocos de construção das proteínas, os aminoácidos (TAN et al., 2006). Os animais não sintetizam todos os aminoácidos necessários, mas obtêm alguns aminoácidos de plantas ou bactérias, sendo assim, herbicidas que inibem a biossíntese de aminoácidos tem um menor impacto sobre animais do que os herbicidas com outros modos de ação (READE e COBB, 2002).

O glyphosate é absorvido preferencialmente pelas folhas, e translocado principalmente pelo floema, sendo um processo bifásico, com uma rápida penetração inicial pela cutícula seguida por uma absorção simplástica lenta, influenciado pelas características da planta, condições ambientais, concentração do herbicida, surfatante utilizado e método de aplicação (MONQUERO et al., 2004; CASELEY e COUPLAND, 1985; FRANZ et al., 1997). Segundo Townson e Butler (1990), com a redução do volume de aplicação e aumento da concentração do glyphosate na calda de pulverização, normalmente sua absorção é aumentada.

A principal dificuldade para a absorção pela parte aérea é a existência de estruturas anatômicas, como o aparecimento de tecido suberificado nas regiões velhas e a deposição de cutina, formando a cutícula nas folhas, destinadas a impedir o dessecação da planta, que impede a livre movimentação de gases e soluções (RODRIGUES, 2009). Chachalis et al. (2001) afirmam que diferenças com relação ao grau de hidrofobicidade da cutícula devido à sua composição, podem refletir na absorção do glyphosate, resultando em menor eficiência do produto quando a cutícula é mais hidrofóbica.

Após a penetração do glyphosate através da cutícula e membrana plasmática dos tecidos fotossintetizantes, ocorre a translocação no simplasto, através dos

tecidos vasculares, até o sítio de ação do herbicida (SATICHIVI et al., 2000), que é um processo essencial para a eficácia do herbicida. O transporte do glyphosate pelo floema já foi demonstrado em várias espécies (SPRANKLE et al., 1975; SCHULTZ e BURNSIDE, 1980; HONEGGER et al., 1986).

Além do transporte de longa distância, deve-se notar que a penetração do glyphosate nas células deve ocorrer em cada célula que possui a enzima alvo (MORIN et al., 1997). Em algumas espécies como *Convolvulus arvensis* (HONEGGER et al., 1986), *Beta vulgaris* (GOUGLER e GEIGER, 1981), e *Vicia faba* (IBAOUI et al., 1986), o glyphosate é transportado para dentro das células por absorção passiva não facilitada, mas dados cinéticos mais detalhados têm mostrado em *V. faba*, que o glyphosate pode ser absorvido por transportadores de fosfato da membrana plasmática (DENIS e DELROT, 1993). Hetherington et al. (1998) verificaram que quando o glyphosate está em baixas concentrações no apoplasto, um mediador ativo é responsável por sua absorção, provavelmente um transportador de fosfato, já quando o produto se encontra em altas concentrações, o processo predominante é a difusão.

A translocação do glyphosate pelo floema segue a mesma rota dos produtos da fotossíntese, deslocando-se das folhas para as raízes ou frutos, onde serão utilizados na respiração, assimilação ou acumulação depois de sua conversão a substâncias como amido, por exemplo (RODRIGUES, 2009). O movimento do herbicida na planta é então influenciado pela quantidade de fotoassimilados translocados para cada uma dessas partes durante o ciclo de vida da planta (MONQUERO et al., 2004). Dessa forma, a translocação do glyphosate é facilitada por condições que favoreçam a fotossíntese na planta (DELLACIOPPA et al., 1986).

O sítio de ação do glyphosate é a inibição da EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase, E.C. 2.5.1. 19) que catalisa a reação na qual o chiquimato-3-fosfato (S3P) reage com fosfoenolpiruvato (PEP), formando 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato (EPSP) e fósforo inorgânico (Pi) (FRANZ et al., 1997). Essa reação ocorre em duas etapas: a ligação da EPSPS ao S3P, formando o complexo EPSPS-S3P, com posterior ligação da PEP neste complexo. A EPSPS é codificada no núcleo, e a biossíntese dos aminoácidos aromáticos ocorre primariamente nos plastídeos (VAUGHN e DUKE, 1991; READE e COBB, 2002).

A inibição da EPSPS pela ação do glyphosate, afeta a rota metabólica do ácido chiquímico, a qual produz os três aminoácidos aromáticos fenilalanina,

tirosina e triptofano. Além disso, essa rota é responsável pela formação dos compostos fenólicos, que podem representar até 35% da biomassa vegetal (BOUDET et al., 1985). Com a inibição da EPSPS, ocorre uma interferência na entrada de carbono na rota do ácido chiquímico pelo aumento da atividade da 3-deoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato sintase (DAHPS), que catalisa a condensação de eritrose-4-fosfato com PEP, considerada a enzima reguladora da rota (DEVINE et al., 1993). O aumento da atividade da DAHPS deve-se aos baixos níveis de arogenato, que é um inibidor alostérico da DAHPS, e é um composto posterior à EPSPS na rota. Com a redução da inibição pelo arogenato, a DAHPS continua atuando, o que provoca altos níveis de ácido chiquímico, já que a rota é interrompida pela inibição da EPSPS. Doses subletais de glyphosate causam um aumento na atividade da DAHPS in vivo (PINTO et al., 1988). In vitro este herbicida não tem efeito sobre a atividade da enzima. No entanto, pela inibição da EPSPS, o herbicida reduz a produção de corismato in vivo, iniciando assim um sinal que leva ao aumento do fluxo de carbono através da elevação da atividade da DAHPS (HERRMANN e WEAVER, 1999).

A quantidade de ácido chiquímico acumulado pela desregulação da rota representa um forte dreno de carbono no ciclo de Calvin, pelo desvio de eritrose-4-fosfato que seria empregado na regeneração de ribulose bifosfato. Esse é um importante efeito da inibição causada pelo glyphosate, que reduz drasticamente a produção fotossintética (GEIGER et al., 1986; GEIGER et al., 1987; SERVIATES et al., 1987; SHIEH et al., 1991).

Acredita-se que existe uma estreita sobreposição dos sítios de ligação da PEP e do glyphosate na EPSPS (FRANZ et al., 1997; DILL, 2005). O glyphosate se liga ao complexo EPSPS-S3P no lugar da PEP, e sua afinidade com o mesmo é 75 vezes maior do que a do PEP e a velocidade de dissociação do glyphosate do sítio de ação é 2000 vezes menor do que a do PEP (REAM et al., 1992). O glyphosate é competitivo com a PEP pela ligação com a EPSPS, mas não competitivo com o chiquimato-3-fosfato (MOUSDALE e COGGINS, 1991; VAUGHN e DUKE, 1991, FRANZ et al., 1997, DILL, 2005). Reade e Cobb (2002) salientaram que o glyphosate não se liga ao sítio ativo da EPSPS, mas se liga a um possível sítio alostérico, resultando em alterações estruturais do sítio de ação, prevenindo a ligação da PEP.

Dessa forma, ocorre a redução da biossíntese dos aminoácidos aromáticos, proteínas e compostos secundários (BENTLEY, 1990; FRANZ et al., 1997) e causa o acúmulo de ácido chiquímico (REDDY et al., 2010; ORCARAY et al., 2010;

MATALLO et al., 2009; REDDY et al., 2008; BUEHRING et al., 2007; NANDULA et al., 2007; PETERSEN et al., 2007; MARÍA et al., 2006; FENG et al., 2004; SINGH e SHANER, 1998; HARRING et al., 1998), ácido quínico (ORCARAY et al., 2010, GOMES, 2011), ácido desidrochiquímico (GOMES, 2011) e alguns ácidos hidroxibenzóicos em folhas e outros órgãos, tais como ácidos protocatecuico e gálico (LYDON e DUKE, 1988; BECERRIL et al., 1989; HERNANDEZ et al., 1999).

Alterações na atividade da enzima EPSPS e de outras enzimas envolvidas na produção de aminoácidos aromáticos e compostos fenólicos podem alterar, de modo significativo, as concentrações do IAA, um importante regulador vegetal. Dentre as suas várias funções nas plantas, o IAA é fundamental para o alongamento celular, a dominância apical, o crescimento de caules e raízes, principalmente em termos de profundidade, e sistema vascular (TAIZ e ZEIGER, 2009). De acordo com Velini et al. (2012b) a interferência na síntese de IAA ocorre quando se realiza a aplicação do glyphosate como maturador em cana-de-açúcar, com quebra da dominância apical, com morte ou não da gema apical, e brotação das gemas laterais. Evidências acumuladas por 50 anos indicam que as plantas podem sintetizar IAA a partir do triptofano por três diferentes rotas: do ácido indol-3-piruvico, ácido indol-3-acetaldoxime e da triptamina (BUCHANNAN et al., 2000).

O conjunto de compostos fenólicos que são afetados pela exposição da planta ao glyphosate, pode ter efeitos importantes na absorção de luz, interferindo no processo fotossintético ou protegendo as plantas contra os efeitos da radiação ultravioleta. Gitz et al. (2004) observaram que os compostos fenólicos têm uma importante função como filtros de luz, com comprimentos de onda correspondentes ao UV-B.

Não está claro como ocorre a regulação da rota do ácido chiquímico, afetada pela aplicação do glyphosate nas plantas, e se os sistemas de controle nas várias espécies de plantas e microorganismos são similares, no entanto, as poucas informações disponíveis indicam que não (VELINI et al., 2012b). Na Figura 1 está descrita a rota simplificada de formação dos aminoácidos aromáticos e compostos fenólicos a partir da via do ácido chiquímico.

Um composto fenólico de grande importância é o ácido salicílico e tem sido bastante discutido a relação do glyphosate com a síntese deste composto, em função do mesmo induzir a resistência a patógenos. O ácido salicílico é o principal composto sinalizador envolvido no acionamento de genes de resistência a patógenos biotróficos. Quanto à sua síntese, predominam as informações indicando a via fenilalanina→ácido transcinâmico→ácido benzóico→ácido salicílico como a única ou predominante em plantas (WARD et al., 1991; RYALS et al., 1996; POPOVA et al., 1997; BUCHANAN et al., 2000; GAILLE et al., 2002; RUUHOLA e JULKINEN-TITTO, 2003; SHAH, 2003). Contudo, trabalhos recentes têm indicado também, a via corismato→isocorismato→ácido salicílico, com a participação da enzima isocorismato sintase (TEGELEN et al., 1999; SHAH, 2003; WILDERMUTH et al., 2001). Segundo Velini et al. (2012b), a relação do glyphosate com a ocorrência de doenças com a síntese do ácido salicílico e fitoalexinas não é simples e demanda muito mais informações do que as disponíveis para ser compreendida.

4.2. Resistência de plantas daninhas a herbicidas

Segundo a Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas aos Herbicidas (HRAC-BR), a resistência de plantas daninhas a herbicidas é definida como a capacidade inerente e herdável de alguns biótipos, dentro de uma determinada população, de sobreviver e se reproduzir após a exposição a uma dose de herbicida, que normalmente seria letal a uma população suscetível da mesma espécie (CHISTOFFOLETI e OVEJERO, 2008).

A Weed Science Society of America definiu resistência como a habilidade herdada de uma planta em sobreviver e se reproduzir após a exposição a uma dose de herbicida normalmente letal ao tipo selvagem, podendo ocorrer naturalmente ou induzidas por algumas técnicas como engenharia genética ou seleção de mutantes produzidos por cultura de tecidos ou mutagênese. Já a tolerância é definida como a habilidade inerente de uma espécie em sobreviver e se reproduzir após o tratamento com herbicida e isto implica que não houve seleção ou manipulação genética para uma planta ser tolerante, ela é naturalmente tolerante (WSSA, 1998).

A resistência de plantas daninhas pode ser também múltipla ou cruzada. A resistência múltipla ocorre quando um biótipo apresenta resistência a um ou

vários herbicidas com mecanismos de ação diferentes, podendo estar relacionada com um ou mais mecanismos de resistência da planta daninha. Quando um determinado biótipo apresenta resistência a dois ou mais herbicidas pertencentes a um mesmo mecanismo de ação é denominada resistência cruzada (CHRISTOFFOLETI e OVEJERO, 2008)

A mudança da composição populacional como mecanismo de fuga para sobrevivência, diminuindo a sensibilidade a determinada medida de controle ocorre em qualquer população em que os indivíduos possuam uma base genética variável quanto à tolerância a essa medida de controle (CHRISTOFFOLETI et al., 2000). Estes autores citam como exemplo o uso do arado, que em um primeiro momento eliminou praticamente todas as plantas daninhas, mas com o passar do tempo essas plantas foram se adaptando a nova situação e voltaram a reinfestar as culturas; e também o advento do plantio direto, que a princípio provocou uma redução drástica da incidência de plantas daninhas, porém, mais tarde, houve uma seleção de espécies que se adaptaram à germinação na nova condição e hoje o controle é tão necessário quanto no sistema convencional (CHRISTOFFOLETI et al., 2000).

A resistência a herbicidas é um processo evolutivo, e sua dinâmica e impacto são dependentes de alguns fatores como: genético (frequência, número, dominância de genes de resistência); biologia das espécies de plantas daninhas (polinização cruzada vs auto polinização, capacidade de produção de sementes, longevidade da semente no banco de sementes, capacidade de movimento da semente e do grão de pólen); herbicida (estrutura química, sítio de ação, atividade residual); operacionais (dose do herbicida, habilidades do operador); e fatores do agroecossistema (práticas de controle de plantas daninhas sem herbicidas, rotação de culturas) (POWLES e YU, 2010).

Desde o primeiro relato de resistência a 2,4-D em 1957 em *Daucus carota* L. (SWITZER, 1957), a resistência a herbicidas aumentou nas principais regiões agrícolas do mundo. Atualmente há 434 casos de plantas daninhas resistentes no mundo, com 237 espécies, sendo 138 dicotiledôneas e 99 monocotiledôneas. A resistência de plantas daninhas tem evoluído em 22 dos 25 sítios de ação conhecidos e para 155 diferentes herbicidas, sendo relatada em 82 culturas em 65 países (HEAP, 2014a).

Os sítios de ação com maiores números de espécies de plantas daninhas resistentes são: inibidores da acetolactato sintase (ALS), inibidores do fotossistema II (PSII) (triazinas) e inibidores da acetil CoA carboxilase (ACCase), com 145, 72 e 46 espécies, respectivamente. As espécies de plantas daninhas com resistência a um maior

número de sítios de ação são: *Lolium rigidum*, *Echinichloa crus-galli* var. *crus-galli* e *Poa annua*. Os três países com maiores números de casos registrados de resistência de plantas daninhas são: Estados Unidos, Austrália e Canadá, com 145, 69 e 60 casos, respectivamente. O Brasil ocupa a sexta posição, com 33 casos de resistência a herbicidas registrados. Atualmente há 8 casos de resistência múltipla registrados no Brasil, com resistência a dois mecanismos de ação: (1) *Bidens subalternans* resistente a inibidores da ALS e do PSII; (2) *Sagittaria montevidensis* resistente a inibidores da ALS e auxinas sintéticas; (3) *Lolium multiflorum* resistente a inibidores da ACCase e glicinas (glyphosate); (4) *Conyza sumatrensis* resistente a inibidores da ALS e glicinas (glyphosate); (5) *Amaranthus retroflexus* resistente a inibidores da ALS e PSII; (6) *Amaranthus viridis* também resistente a inibidores da ALS e PSII; (7) *Euphorbia heterophylla* resistente a inibidores da ALS e da protoporfirinogênio IX oxidase (PROTOX); e (8) *Echinichloa crusgalli* var. *crus galli* resistente a inibidores da ALS e auxinas sintéticas (HEAP, 2014a).

A resistência de plantas daninhas vem evoluindo em culturas agrícolas no mundo todo pela pressão de seleção ocasionada pelo grande uso de herbicidas. Plantas com uma resistência natural sobrevivem à exposição ao herbicida, reproduzem-se e a cada geração que é exposta ao herbicida aumenta o número de plantas resistentes na população, dominando a população de plantas suscetíveis (VENCILL et al., 2012). No primeiro ano o biótipo resistente não infesta totalmente a área, portanto, é identificado o surgimento da resistência normalmente quando 30% das plantas de uma população apresentam resistência. A resistência geralmente acontece em manchas e aumenta em progressão geométrica com a aplicação repetitiva de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação, até o domínio da área (CHRISTOFFOLETI e OVEJERO, 2008).

Os mecanismos de resistência de plantas daninhas a herbicidas podem ou não estar relacionados com o sítio de ação. Os mecanismos de resistência baseados no sítio de ação podem ser a perda de afinidade pelo sítio de ação na enzima, resultado de mutações que alteram a ligação do herbicida no sítio, geralmente uma enzima, prevenindo ou reduzindo a habilidade do herbicida em ligar no alvo; ou a amplificação/superexpressão do gene, que aumenta a produção da enzima alvo, necessitando uma maior concentração do herbicida para alcançar o sítio de ação para inibir a enzima e causar a morte da planta. Os mecanismos de resistência não baseados no sítio de ação podem ser devido ao elevado metabolismo, ou seja, aumento da habilidade da planta em metabolizar (degradar) um herbicida antes que ele cause a morte da mesma; ao decréscimo da absorção e/ou

translocação que resulta em uma restrição do movimento do herbicida até o sítio de ação permitindo a sobrevivência da planta; ou sequestro do herbicida nas paredes celulares ou dentro dos vacúolos, reduzindo a concentração do herbicida que alcança o sítio de ação (HEAP, 2014b; POWLES e YU, 2010).

A luta contra a resistência de plantas daninhas passa por um momento crítico. Durante mais de 40 anos os produtores lidaram com a resistência de plantas daninhas pelo fato do fornecimento por parte da indústria com um fluxo relativamente constante de novos herbicidas com novos sítios de ação, o que já não é mais a realidade. A indústria não tem introduzido no mercado ao longo dos últimos anos novos herbicidas com diferentes mecanismos de ação, e o rápido aumento de resistência múltipla deixam cada vez mais muitos agricultores com problemas para controlar as plantas daninhas (HEAP, 2014b). O advento das culturas transgênicas resistentes ao glyphosate também contribuiu fortemente para uma diminuição nos esforços para o descobrimento de novos herbicidas e mecanismos de ação (DUKE, 2011).

4.3. Resistência de plantas daninhas ao glyphosate

O glyphosate tem sido globalmente e extensivamente utilizado desde 1974, e até 1994, não tinham sido relatadas plantas daninhas resistentes a ele (DYER, 1994). No entanto, desde a primeira confirmação (POWLES et al. 1998; PRATLEY et al., 1999), a resistência ao glyphosate tem evoluído rapidamente e tornando-se um problema muito significativo para a agricultura mundial. O maior fator de aceleração da evolução de plantas daninhas resistentes ao glyphosate tem sido o uso extensivo e repetitivo, principalmente em função da ampla adoção de culturas transgênicas resistentes a este herbicida, sendo que o mesmo tem substituído quase todos os outros herbicidas ou outros meios de alcançar o controle das plantas daninhas. Esta confiança singular no glyphosate se tornou uma intensa fonte de seleção para alguns genes de resistência ao herbicida (POWLES, 2003; 2008).

Com a introdução das culturas transgênicas resistentes ao glyphosate os agricultores passaram a confiar nas aplicações deste herbicida para o controle das plantas daninhas, resultando em um declínio na descoberta de novos herbicidas além de uma nova geração de agricultores com pouco conhecimento de técnicas para o controle das plantas daninhas. Com isso, a partir da metade dos anos 2000, o aparecimento generalizado de

plantas daninhas resistentes ao glyphosate, em particular, espécies de *Conyza*, *Amaranthus* e *Ambrosia* em culturas geneticamente modificadas, advertiu os agricultores de que o uso do glyphosate sozinho não é sustentável. Portanto, iniciou-se uma tendência de maior diversidade no programa de herbicidas, principalmente com o uso de herbicidas com ação em pré-emergência. A resistência múltipla tornou-se então a maior preocupação para a sustentabilidade do controle de plantas daninhas, sendo que entre 2015 e 2025, a resistência múltipla forçará mudanças drásticas nos programas de controle de plantas daninhas (HEAP, 2014b).

O desenvolvimento da resistência de plantas daninhas ao glyphosate é um evento de escala mundial, que ocorre muito rapidamente. Se os sistemas de produção não forem modificados para contrapor a este efeito, existe um risco de que o uso deste herbicida sofra severas restrições nos próximos anos, com impactos altamente negativos para vários sistemas de produção conservacionistas, como o cultivo mínimo em florestas de eucalipto e o plantio direto em soja ou milho (VELINI et al., 2012a).

Atualmente, existem 29 espécies de plantas daninhas resistentes ao glyphosate (HEAP, 2014a). De acordo com a base de dados de registro de plantas daninhas resistentes a herbicidas no mundo (HEAP, 2014a), o primeiro biótipo com resistência a glyphosate no Brasil foi detectado na espécie *Lolium multiflorum*, no ano de 2003 (VARGAS et al., 2005), em seguida biótipos de duas espécies de buva (*C. bonariensis* e *C. canadensis*) (VARGAS et al., 2007; LAMEGO e VIDAL, 2008), *Digitaria insularis* (ADEGAS et al., 2010; CARVALHO et al., 2011), *C. sumatrensis* (SANTOS et al., 2012; SANTOS et al., 2014) e recentemente em *Chloris polidactyla* (BRUNHARO, 2014).

Os mecanismos confirmados de resistência de plantas daninhas ao glyphosate são: uma única mudança em um códon do gene que codifica a EPSPS; a amplificação/supereexpressão do gene da EPSPS, e a reduzida translocação devido ao sequestro do glyphosate dentro do vacúolo das folhas tratadas (SHANER et al., 2012).

A resistência ao glyphosate baseada no sítio de ação, primeiro identificada em um biótipo de *Eleusine indica* (LEE e NGIM, 2000), foi devido a uma substituição por serina na Pro-106 (Pro-106-Ser), em uma região altamente conservada do gene EPSPS (BAERSON et al., 2002). Subsequentemente, substituições por treonina e alanina na Pro-106 foram relatada em populações resistentes ao glyphosate em *E. indica* (NG et al., 2003) e *Lolium* (YU et al., 2007), respectivamente. Agora, essas três substituições na Pro-106 têm sido identificadas em populações de *E. indica* e *Lolium* em várias partes do

mundo (KAUNDUN et al., 2008, PRESTON et al., 2009), e recentemente foi conferida em *Amaranthus tuberculatus* (NANDULA et al., 2013). Estas substituições conferem somente um modesto grau de resistência ao glyphosate.

A inibição da EPSPS pelo glyphosate ocorre através da ocupação do sítio de ligação da PEP pelo herbicida (ESCHENBURG et al., 2002; HEALY-FRIED et al., 2007; SCHONBURNN et al., 2001). Trabalhos que evidenciam substituições da Pro-106 da EPSPS de *Escherichia coli* e a estrutura da ligação EPSPS-S3P-glyphosate, revelam que substituições na Pro-106 causam um ligeiro estreitamento da cavidade do sítio de ligação do glyphosate/PEP, que confere resistência ao glyphosate mas preserva o funcionamento da enzima (HEALY-FRIED et al., 2007). No entanto, quando ocorrem substituições na Gly-101 e Thr-102, um alto nível de resistência ao glyphosate é observado, pois ocorre uma redução no volume do sítio de ligação do glyphosate/PEP, reduzindo a afinidade na enzima pelo PEP (ESCHENBURG et al., 2002, FUNKE et al., 2009). Portanto, mutações que permitem ambas as ligações do glyphosate e PEP, mantendo o funcionamento da EPSPs podem ser muito raras.

Outro mecanismo que envolve a enzima alvo do glyphosate é um grande aumento na quantidade da EPSPS devido à amplificação do gene (GAINES, 2010), de modo que as doses de glyphosate aplicadas no campo não possam inibir a atividade enzimática e conseqüentemente a rota do ácido chiquímico (DUKE, 2014). O primeiro caso foi em *Amaranthus palmeri* em cultura geneticamente modificada resistente ao glyphosate nos Estados Unidos, onde essa planta daninha desenvolveu um alto nível de resistência ao glyphosate, mais do que 8 vezes no laboratório e 12 vezes no campo (CULPEPPER et al., 2006). Outro biótipo de *A. palmeri* foi 20 vezes menos sensível ao glyphosate do que o tipo selvagem (WHITAKER et al., 2007). Gaines et al. (2010) relataram que plantas individuais de uma população de um biótipo resistente tiveram de 5 a 60 cópias adicionais do gene EPSPS. Esses genes adicionais foram espalhados por todo o genoma, com cópias em todos os cromossomos. As cópias adicionais (amplificação do gene) correlacionaram positivamente com o mRNA da EPSPS e com a atividade enzimática, portanto, estas plantas requerem muito mais glyphosate para que ocorra o bloqueio da rota do ácido chiquímico. Este mecanismo de amplificação da EPSPS foi encontrado em *L. perene* spp. *multiflorum* (SALAS et al., 2012) e *Kochia scoparia* (WIERSMA, 2012), com até 25 e 9 cópias adicionais do gene, respectivamente. Tranel et al. (2011) relatou que pelo menos um dos mecanismos de resistência em *Amaranthus tuberculatus* é devido à amplificação da EPSPS.

A resistência ao glyphosate pode também não estar relacionada com o sítio de ação, e ser devido a uma redução na taxa de translocação do herbicida na planta e acúmulo nos vacúolos das células. Ao entrar nas folhas das plantas, o glyphosate possui considerável mobilidade via xilema e floema (em geral, a translocação do glyphosate acompanha a translocação de fotoassimilados da fonte para o dreno), portanto, a translocação do glyphosate na planta é necessária para a toxicidade do mesmo (POWLES e YU, 2010). A reduzida translocação do glyphosate tem sido relatada em algumas espécies com resistência ao herbicida, como *C. bonariensis* (DINELLI et al., 2008), *C. canadensis* (FENG et al., 2004), e *L. multiflorum* (LORRAINE-COLWILL et al., 2003; WAKELIN et al., 2004).

A reduzida translocação tanto em *Lolium* spp. como em *C. canadensis* devem estar associadas ao sequestro do glyphosate para dentro do vacúolo das células das folhas tratadas (GE et al., 2010, 2011, 2012), sendo que pouco ou nenhum sequestro é encontrado nos biótipos suscetíveis. Em *C. canadensis*, baixas temperaturas reduzem o sequestro do glyphosate, causando a perda da resistência (GE et al., 2011). Esse sequestro de glyphosate é devido provavelmente a um transportador de membrana, similar a uma *E. coli* resistente ao glyphosate com superexpressão de um gene que codifica um transportador de membrana do herbicida (STAUB et al., 2012). Algumas evidências moleculares sugerem que proteínas associadas com o tonoplasto podem exercer papéis no mecanismo de sequestro do glyphosate no vacúolo em *C. canadensis*, incluindo transportadores ABC e uma proteína intrínseca do tonoplasto (TIP) (NOL et al., 2012; PENG et al., 2010; YUAN et al., 2010). De fato, a evolução da resistência ao glyphosate devido à restrita translocação na planta é mais comum do que a mutação da EPSPS (Pro-106), embora algumas populações de *Lolium* possuam ambos mecanismos. (PRESTON et al., 2009, YU et al., 2007).

Algumas plantas podem metabolizar lentamente o glyphosate a metabólitos menos ou não tóxicos (DUKE, 2011). Portanto, os genes que codificam enzimas que irão realizar a desintoxicação do glyphosate podem existir em algumas espécies de plantas, embora nem os genes e nem as enzimas tenham sido caracterizados (DUKE, 2014). Pesquisadores relataram a ocorrência de duas espécies de plantas daninhas resistentes ao glyphosate pelo aumento do metabolismo do herbicida nestas plantas, sendo elas: *Digitaria insularis* (CARVALHO et al., 2011) e *C. canadensis* (GONZALEZ-TORRALVA et al., 2012). Podem haver alguns outros genes secundários que contribuem para a resistência não

baseada no sítio de ação. Há evidência de reduzida penetração do glyphosate em folhas de alguns biótipos resistentes de *Lolium* (MICHITTE et al., 2007; NANDULA et al., 2008) e um biótipo resistente de *Sorghum halepense*.

A hegemonia do glyphosate no controle de plantas daninhas precisa ser urgentemente associada a ações voltadas à sustentabilidade do seu uso. A redução da diversidade, associada ao uso contínuo de uma única prática de controle, cria condições altamente favoráveis para o desenvolvimento de plantas daninhas resistentes à mesma, ou à seleção de espécies tolerantes. Para evitar ou minimizar a seleção de flora e a resistência, é essencial ampliar a diversidade das práticas de controle. É fundamental explorar o potencial de controle das próprias culturas, das coberturas de solo e associar, sempre que possível, o glyphosate a outros herbicidas e outras práticas de controle (VELINI et al., 2012a)

4.4. Confirmação da resistência de plantas daninhas a herbicidas

O ensaio clássico para confirmação da resistência de plantas daninhas a herbicidas inicia-se pela coleta de sementes de plantas sobreviventes em campos suspeitos, semeadura em vasos e realização da aplicação do herbicida. Para representar as áreas problemáticas, sementes de várias plantas necessitam ser coletadas (MOSS, 1999), mas o número de plantas usadas para constituir uma amostra varia grandemente. O objetivo é coletar sementes suficientes e de boa qualidade para conduzir vários testes, e prevenir a exposição das sementes a condições desfavoráveis como calor e umidade, o que provocaria a deterioração ou a dormência secundária (BURGOS et al., 2013).

Para testar a resistência de uma espécie de planta daninha pela primeira vez, Burgos et al. (2013) recomenda conduzir um experimento para determinação de uma curva de dose-resposta em relação a um padrão suscetível, que vai permitir a visualização da magnitude da resistência e a dose discriminatória. Em testes subsequentes de outras populações da mesma espécie, uma única dose pode ser utilizada. Muitos pesquisadores utilizam a dose recomendada em ensaios em vasos quando se tem um grande número de amostras resistentes, comparando-as com um padrão suscetível e as respectivas testemunhas não tratadas, porém, em alguns casos, duas a quatro doses têm sido utilizadas em ensaios de confirmação de resistência (KALOUMENOS et al., 2011; MANEECHOTE et al., 2005; WISE et al., 2009).

O experimento de dose-resposta geralmente é conduzido para determinar o nível de resistência de determinado biótipo e obter uma rápida visão do potencial mecanismo de resistência. Nos últimos anos, os pesquisadores têm utilizado uma grande variedade de doses (4 a 15) com cerca de um total de 3 a 200 plantas por dose (MCMULLAN e GREEN, 2011; HAUSMAN et al., 2011; HAMOUZOVÁ et al., 2011; CRUZ-HIPOLITO et al., 2011; OWEN et al., 2012; GUI-QI et al., 2011; ZHENG et al., 2011; MEROTTO et al., 2009; XU et al., 2010; HUAN et al., 2011; DICKSON et al., 2011; SALAS et al., 2012; GHEREKHLOO et al., 2011; HAN et al., 2012; CRUZ-HIPOLITO et al., 2012).

A avaliação das variáveis são peso fresco ou seco de tecidos da parte aérea, com ou sem avaliações visuais de injúria. Qualquer uma destas respostas pode ser utilizada para estimar os níveis de resistência ou a quantidade de herbicida que pode causar um certo nível de redução de crescimento ou controle. A resposta da planta é avaliada dentro de uma a quatro semanas após a aplicação do herbicida dependendo do modo de ação. Para herbicidas aplicados em pós emergência, uma semana após o tratamento é apropriada para aqueles com ação de contato, enquanto que herbicidas com ação mais lenta são melhores avaliados de 2 a 4 semanas após a aplicação (BURGOS et al., 2013).

A resistência a herbicidas é confirmada após a comparação das curvas de dose-resposta do herbicida para os biótipos com suspeita de resistência em relação a um biótipo suscetível. A partir do ajuste das curvas de dose-resposta, podem-se calcular a dose do herbicida necessária para proporcionar 50% de controle (C_{50}) ou 50% de redução do crescimento da planta daninha (GR_{50}) (CHRISTOFFOLETI e OVEJERO, 2008), o que permite quantificar o nível de resistência (SEEFELDT et al., 1995). Assim, no processo de investigação da resistência, é possível determinar os fatores de resistência (FRs) das populações e assim determinar, para cada caso, se há resistência de baixo ou alto nível (GAZZIERO et al., 2008).

O ensaio clássico de dose resposta, feito com plantas inteiras, requer uma grande quantidade de espaço e leva em geral, até dois meses para que o resultado seja obtido, portanto não é o mais recomendado para testes em grande escala. Em razão disso, várias tentativas estão sendo feitas com o objetivo de desenvolver ensaios para confirmação da resistência que sejam mais rápidos e permita utilizar as informações a tempo em relação ao manejo das falhas de controle de plantas daninhas (BURGOS et al., 2013).

Além do ensaio clássico para detecção da resistência de plantas daninhas a herbicidas, vários outros métodos mais rápidos têm sido desenvolvidos, alguns possuem maiores vantagens devido ao menor uso de recursos, e outros mais sofisticados devido a necessidade de mão de obra e equipamentos especializados (VARGAS et al., 2014). No caso do glyphosate, o acúmulo de ácido chiquímico tem sido estudado para avaliar a sensibilidade da enzima EPSPS ao herbicida utilizando métodos cromatográficos e espectrofotométricos (ZELAYA et al., 2011). Vargas et al. (2014) afirmam que a extração de ácido chiquímico diretamente do tecido da planta requer um longo período e grandes quantidades de reagente, no entanto, Matallo et al. (2009) apresentou um método de extração utilizando água como solvente e micro-ondas como uma forma mais simples de extrair o ácido chiquímico. Em ensaios para avaliar a resistência ao glyphosate por meio da quantificação do ácido chiquímico, deve-se sempre incluir altas concentrações de glyphosate, pois todas as populações resistentes ao glyphosate testadas até o momento acumulam chiquimato em concentrações muito altas de glyphosate (SINGH e SHANER, 2008).

Vários ensaios com disco foliar vêm sendo desenvolvidos nos últimos 30 anos para diagnosticar populações de plantas daninhas resistentes a herbicidas com diferentes mecanismos de ação. Este tipo de ensaio possui as vantagens de ser rápido e não destrutivo. Embora muitos desses ensaios possam ser utilizados para entender o mecanismo de resistência ao herbicida, eles também podem ser utilizados como uma seleção inicial para detecção de populações resistentes no campo. Alguns cuidados devem ser tomados para realização destes ensaios, como a seleção cuidadosa do tecido apropriado de plantas saudáveis que estejam crescendo vigorosamente, pois dependem de tecidos vivos (BURGOS et al., 2013). Os ensaios com inibidores da ALS e EPSPS (acúmulo de chiquimato) requerem o uso de tecidos jovens e com rápida expansão, pois as enzimas são mais ativas em tecidos meristemáticos e a atividade enzimática decresce rapidamente em folhas maduras (GERWICK et al., 1993; SHANER et al., 2005). As plantas não podem estar sob nenhum tipo de estresse para que a atividade enzimática não seja reduzida. Em muitos casos os ensaios dependem da folha fotossinteticamente ativa, portanto precisam ser conduzidos em condições de luminosidade (BURGOS et al., 2013).

Outras técnicas vêm sendo utilizadas para o diagnóstico e muitos casos de resistência de plantas daninhas têm sido elucidados a nível de DNA. A vantagem primária dos testes baseados no DNA em relação a outros métodos é a sua velocidade; um

típico teste de resistência baseado na PCR (reação em cadeia da polimerase) pode fornecer uma resposta positiva ou negativa dentro de um dia. Além disso, eles podem ser facilmente escalados para análises de alto rendimento, permitindo um único laboratório correr centenas de amostras em um dia com mínimo espaço necessário (BURGOS et al., 2012).

4.5. Aspectos da biologia e resistência ao glyphosate de *Conyza* spp.

O gênero *Conyza* spp. (buva) inclui aproximadamente 50 espécies (KISSMANN e GROTH, 1999). As espécies com maior ocorrência são a *Conyza canadensis* (L.) Cronq., *Conyza bonariensis* (L.) Cronq. e *Conyza sumatrensis* (Retz.) E. Walker. Geralmente essas plantas ocorrem em pomares, vinhedos, em culturas anuais como trigo, milho, soja e algodão, assim como em áreas de pastagens e também áreas não cultivadas (VARGAS et al., 2014).

A *Conyza* spp. é uma planta de ciclo anual ou bianual, dependendo das condições ambientais (REGEHR e BAZZAZ, 1979). Para as três espécies, a produção de sementes ocorre preferencialmente no inverno, e são muito prolíficas, sendo que a *C. canadensis* pode produzir de 5000 a 200000 sementes por planta (HOLM et al., 1997). São plantas que apresentam boa adaptabilidade em sistemas conservacionistas do solo, como o plantio direto, o cultivo mínimo e em áreas de fruticultura que adotam o manejo integrado de produção (BHOWMIK e BEKECH, 1993).

As espécies do gênero *Conyza* possuem um número básico de cromossomos de 9, sendo que configurações diploide, triploide, tetraploide e hexaploide têm sido relatadas (GOLDBLATT, 1985; RAZAQ et al., 1994; THEBAUD e ABBOTT, 1995; CARR et al., 1999). As espécies *C. canadensis* e *Conyza chilensis* apresentam configuração $2n=18$ (THEBAUD e ABBOTT, 1995; SOLBRIG et al., 1964). Há evidências da existência de poliploidia em *C. sumatrensis* e *C. bonariensis* ($2n=54$) (GOLDBLATT, 1985; THEBAUD e ABBOTT, 1995). A poliploidia é um traço comum entre muitas plantas invasoras que obtiveram sucesso (CLEGG e BROWN, 1983) e é mais comum quando o número básico de cromossomos é 6 ou 9 (SOLBRIG et al., 1964). A correlação entre espécies poliploides com a distribuição espacial e preferências ecológicas foram demonstradas por Manton (1949) e Solbrig et al. (1964). Ehrendorfer (1980) relatou que as

espécies poliploides são mais vastamente distribuídas na Europa do que as espécies diploides.

Através de um traço quantitativo e análise de isozimas, Thebaud e Abbott (1995), relataram uma similaridade de 90% entre *C. bonariensis* e *C. sumatrensis*, e menos de 40% de similaridade existiu entre essas duas espécies e a *C. canadensis*. Este resultado é suportado pelo nível taxonômico entre as espécies, com a separação de *C. canadensis* das outras duas espécies (*C. bonariensis* e *C. sumatrensis*) ocorrendo na primeira divisão da chave taxonômica, baseada nas brácteas involucrais glabras ou pilosas, respectivamente. Esta semelhança genética, no entanto, não está relacionada com um nível biogeográfico (GREEN, 2010). Circunvis et al. (2014) relataram baixa diversidade genética entre biótipos de *C. sumatrensis* provenientes da região noroeste do estado do Paraná, através de análise de isozimas, no entanto, os autores esperavam encontrar uma alta diversidade genética entre as plantas desta espécie devido à alta adaptabilidade da mesma. Dessa forma, a frequente exposição a herbicidas pode levar à redução a heterozigosidade, que é ainda mais reduzida pela seleção de biótipos resistentes, implicando baixos níveis de diversidade genética (CIRCUNVIS et al., 2014).

Como já mencionado, as espécies de *Conyza* são prolíficas e portanto são grandes produtoras de sementes (KEMPEN e GRAF, 1981; WU et al., 2007; HAO et al., 2009). Uma grande variação nos níveis de produção de sementes tem sido relatada, com *C. bonariensis* produzindo até 375.561 sementes por planta (KEMPEN e GRAF, 1981) e *C. sumatrensis* mais do que 60.000 sementes por planta (HAO et al., 2009). Para *C. canadensis* foi relatada a produção de 200.000 sementes por planta, com uma correlação positiva entre altura de planta e fecundidade total (WEAVER, 2001; SHIELDS et al., 2006).

A relação entre densidade de plantas e níveis de produção de sementes foi estudada em *C. canadensis* por Bhowmik and Bekech (1993), que observaram aumento no número de sementes produzidas por planta com o decréscimo da densidade, sendo que cerca de 100.000 sementes foram produzidas por planta em uma densidade de 200 plantas por metro quadrado e 200.000 sementes foram produzidas por planta quando a densidade passou a ser de 10 plantas por metro quadrado. Este resultado corrobora com o estudo de Palmblad (1968) que relatou competição intraespecífica em *C. canadensis*. As sementes são dispersas dentro de um a dois dias a partir da maturação do capítulo, dependendo do clima (THEBAUD et al., 1996), podem facilmente absorver água após a

dispersão (KARLSSON e MILBERG, 2007), e podem germinar prontamente após a dispersão em condições favoráveis de temperatura e umidade.

A dispersão das sementes das espécies de *Conyza* spp. acontece principalmente pelo vento (anemocoria), de uma maneira abiótica (WU, 2007), e é um dos vetores de disseminação de sementes mais estudado. Andersen (1992) determinou a velocidade média de uma semente de *C. bonariensis* como 29,11 cm s⁻¹. Características estruturais de sementes que reduzem a velocidade da queda, como papus com uma elevada área superficial em relação ao volume total, aumentam a probabilidade de transporte lateral por correntes de ar (CHAMBERS e MACMAHON, 1994; COUSENS e MORTIMER, 1995). Sementes pequenas, como as das espécies de *Conyza* spp., possuem uma menor habilidade competitiva e de sobrevivência quando comparadas com sementes maiores, ainda que a capacidade e extensão da dispersão sejam maiores (HARPER et al., 1970).

O florescimento em *C. bonariensis* é favorecido por um longo fotoperíodo, com cerca de 14 horas (AMSELLEM et al., 1993). Uma planta individual de *C. bonariensis* produz flores sequencialmente e seu período de florescimento pode durar de um a quatro meses (THEBAUD et al., 1996). Thebaud e Abbott (1995) relataram a idade no momento do pendoamento de *C. bonariensis*, *C. canadensis* e *C. sumatrensis* como 11, 13,6 e 11 semanas, respectivamente, e a idade no florescimento de 13,9, 22,4 e 19,8 semanas, respectivamente. Os mesmos autores também reportaram o número de flores por capítulo para *C. bonariensis*, *C. canadensis* e *C. sumatrensis* como 210,5, 68,3 e 94,6, respectivamente. Estas medidas quantitativas apoiam a ideia de que diferentes espécies de *Conyza* spp. possuem diferentes escalas de tempo para cada estágio de desenvolvimento.

Em estudo realizado por Shrestha et al. (2010) com biótipos de *C. canadensis* resistentes e suscetíveis ao glyphosate, um menor período de tempo necessário para que plantas resistentes alcançassem o florescimento e a produção de sementes foi observado quando comparado com as suscetíveis, crescendo em condições ambientais similares. Estes resultados demonstram um maior desenvolvimento inicial do biótipo resistente, fornecendo um maior potencial competitivo quando comparado com o biótipo suscetível (SHRESTHA et al., 2010). Isto pode estar associado com uma melhor habilidade em usar os recursos do meio, incluindo a radiação solar, facilitada pela maior área foliar que deve favorecer a absorção da radiação, ou um possível aumento dos pigmentos fotossintéticos no biótipo resistente (KASPARY et al., 2014).

As espécies de *Conyza* spp. possuem reprodução autógama, com auto compatibilidade, e como resultado possuem uma taxa reduzida do pólen ao óvulo comparado com reprodutores xenógamos (CRUDEN, 1976). Dados filogenéticos obtidos por Noyes (2000), suportaram que a autogamia tem evoluído independentemente em espécies de *Conyza* spp. e o tamanho da flor é bem pequeno pois não possui nenhuma exigência para atrair um polinizador, sendo assim, possui um eficiente uso da energia (Ornduff, 1969). A taxa do pólen para o ovário foi relatada para *C. sumatrensis* como 98,8 (Hao et al., 2009), em contrastes de 988,6 em espécies xenógamas da família Asteraceae, como *Bidens leptcephala* Sherff. (CRUDEN, 1976).

Em um estudo que explorou as diferenças na habilidade invasiva entre as espécies de *C. sumatrensis* e *C. canadensis*, Thebaud et al. (1996) relataram que o catalisador para o início do pendoamento está mais relacionado com a disponibilidade de recursos do que com a luz em ambas as espécies. Embora o catalisador para início do pendoamento tenha sido similar em ambas as espécies, houveram diferenças significativas no tempo para o pendoamento, sendo que a *C. sumatrensis* pendoou mais cedo do que a *C. canadensis* (THEBAUD et al., 1996). Um menor período para o alongamento do caule poderia fornecer uma vantagem competitiva para a espécie em áreas vegetadas (THEBAUD et al., 1996).

As espécies de plantas daninhas dos gêneros *Lolium*, *Amaranthus*, *Conyza* e *Echinochloa* são algumas das piores plantas daninhas resistentes no mundo. As plantas daninhas destes gêneros possuem um alto grau de diversidade genética e tem a capacidade comprovada de desenvolver resistência a um grande número de sítio de ação de herbicidas (HEAP, 2014b). Segundo CIRCUNVIS et al. (2014), a forma como as populações estão geneticamente estruturadas é uma informação importante para orientar o desenvolvimento de planos efetivos de controle das plantas daninhas, porque um dos fatores que podem contribuir para determinar respostas diferentes de plantas daninhas à aplicação de herbicidas é a variabilidade genética presente em populações de diferentes espécies.

A existência de variabilidade genética em indivíduos de uma população aumenta a chance de alguns para responder diferentemente a alterações do meio ambiente, de modo que isso possa garantir a preservação da espécie. Assim, as populações de plantas daninhas com maior diversidade genética podem se constituir num obstáculo para o controle pelo fato de as plantas apresentarem respostas variáveis aos tipos e/ou concentrações diferentes de herbicidas. A alta variabilidade genética dentro de populações

de plantas daninhas pode indicar significativa quantidade de variação genética para escapar dos efeitos do agente de controle e, também, pode favorecer a seleção de genótipos resistentes (ALLENDORF e LUIKART, 2007).

A boa adaptabilidade da buva aos sistemas conservacionistas de solo, como semeadura direta e cultivo mínimo faz com que esta espécie esteja presente em muitas áreas de cultivo. Outra característica é a autopolinização e a grande quantidade de sementes produzidas que possuem grande facilidade de dispersão (DAUER et al., 2007). Portanto, a buva é considerada uma planta daninha com alta adaptabilidade ecológica, facilitando a sobrevivência de biótipos resistentes, o que vem sendo observado atualmente nas áreas de produção agrícola (LAMEGO et al., 2013).

No Sul do Brasil a buva (*Conyza* spp.) é considerada uma das principais plantas daninhas em lavouras de soja, e foi selecionada em lavouras da cultura transgênica devido ao uso repetido do herbicida glyphosate, o que ocasionou um grande aumento na pressão de seleção (SANTOS et al., 2014). A resistência ao glyphosate já foi comprovada em biótipos de *C. bonariensis* e *C. canadensis* no Rio Grande do Sul (VARGAS et al., 2007; LAMEGO e VIDAL, 2008), e de *C. sumatrensis*, no Paraná (SANTOS, 2012). Até hoje, no mundo, foram registrados 12 casos de *C. bonariensis*, 37 de *C. canadensis* e 4 de *C. sumatrensis* resistentes ao glyphosate (HEAP, 2014a).

Atualmente, a buva encontra-se disseminada em praticamente todas as regiões produtoras do Brasil, com maior ocorrência nos cultivos de grãos das regiões Sul e Sudeste, com alguns focos na região Centro-Oeste do país (DAN et al., 2013). A maior ocorrência desta espécie é em áreas onde o distúrbio do solo é limitado (sistemas conservacionistas) e quando o controle de plantas daninhas é realizado basicamente com o herbicida glyphosate, como nas lavouras de soja e áreas de produção de frutíferas perenes (VIDAL et al., 2007; YAMAMUTI e BARROSO, 2010).

Os fatores que têm contribuído para o aumento na ocorrência de *Conyza* spp. nos sistemas agrícolas brasileiros além da particular capacidade da espécie em dispersar as sementes, destaca-se a não adoção de rotação de culturas, aplicações contínuas e frequentes de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação, o que coincide com a adução do glyphosate na soja transgênica, e o baixo nível de conhecimento e identificação das espécies (LAMEGO e VIDAL, 2008).

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação, no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM), pertencente à Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP campus de Botucatu/SP. Foram realizados três estudos principais e um preliminar com quatro populações de buva (*Conyza* spp.) coletadas em diferentes municípios do estado de São Paulo (Tabela 1). A população 1 foi coletada em uma área de cana-de-açúcar com baixa frequência de aplicação de glyphosate. A população 2 foi coletada em uma área não agrícola. A população 4 foi coletada em uma área experimental com rotação de cultivo de milho e soja, com intensa aplicação de glyphosate no manejo. Esta população foi utilizada na condução dos experimentos que compuseram o estudo preliminar. As sementes provenientes da geração seguinte desta população que foi mantida em casa-de-vegetação, foram utilizadas nos próximos estudos também com a denominação de população 4.

Os experimentos do estudo preliminar com a população 4 foram realizados nos meses de dezembro de 2013 e janeiro de 2014; os experimentos com as populações 1 e 2 tiveram início em abril de 2014, a população 3 teve seus experimentos iniciados no mês de maio de 2014, e no mês de junho de 2014 foram iniciados os experimentos com a população 4.

Após a coleta das sementes, as mesmas foram armazenadas em local sem a presença de luz e com baixa umidade para que não houvesse degradação ou redução de germinação. As sementes foram semeadas em bandejas de isopor com 288 células preenchidas com substrato Carolina[®] composto de turfa de esfagno, vermiculita e casca de

arroz carbonizada. Após a emergência das plântulas, as mesmas foram desbastadas com auxílio de uma pinça, deixando-se de uma a duas plântulas por célula. No momento em que as plântulas apresentavam 2 folhas, foram transplantadas para vasos preenchidos com 250 mL do mesmo substrato utilizado nas bandejas. Tanto as bandejas como os vasos receberam irrigação diária para que não houvesse estresse hídrico nas plantas.

Tabela 1. Identificação dos municípios e coordenadas geográficas dos locais de coleta das sementes das diferentes populações de *Conyza* spp.

Biótipo	Município	Coordenadas
População 1 (P1)	Dobrada /SP	Lat: 21°31'4.18''S Long: 48°25'47.89''O
População 2 (P2)	Louveira / SP	Lat: 23°6'21.84''S Long: 46°57'27.07''O
População 3 (P3)	Mogi Mirim /SP	Lat: 22°28'3.13''S Long: 47°6'25.19''O
População 4 (P4)	Botucatu / SP	Lat: 22°48'16.90''S Long: 48°25'36.44''O

A aplicação dos tratamentos com diferentes doses do herbicida glyphosate foi realizada quando as plantas apresentavam de 5 a 6 folhas verdadeiras totalmente expandidas (Figura 2). Os tratamentos utilizados em todos os experimentos estão apresentados na Tabela 2, exceto para o experimento preliminar, que não foi submetido à aplicação da maior dose de glyphosate (32 L ha⁻¹). As doses foram definidas com base na dose registrada de glyphosate para controle de *Conyza* spp. (720 g e.a. ha⁻¹) (Rodrigues e Almeida, 2011), sendo esta considerada como 100%.

Para aplicação dos tratamentos descritos na Tabela 2 foi utilizado um pulverizador estacionário (Figura 2), pertencente ao NUPAM, constituído por estrutura metálica (barra de pulverização), com 1,5 metros de largura, que desloca-se por uma área útil de 6,0 m² no sentido do seu comprimento. A barra é tracionada por um conjunto de motor elétrico e modulador de frequência, tornando possível o controle da velocidade de trabalho da barra. A barra foi equipada com quatro pontas de pulverização XR 110.02 VS, espaçadas em 0,5 m entre si, e dispostas a 0,5 m de altura em relação às unidades experimentais. A pressão de trabalho utilizada pelo equipamento foi de 2,0 kgf cm⁻², com velocidade de 3,6

km h⁻¹ e consumo de calda de 200 L ha⁻¹. O produto comercial utilizado para o preparo das caldas de pulverização foi o Roundup Original® (360 g e.a. L⁻¹).

Tabela 2. Doses de glyphosate em gramas do equivalente ácido e litros do produto comercial por hectare utilizadas nos experimentos.

Tratamento	Dose de glyphosate (L ha ⁻¹)	Dose de glyphosate (g e.a. ha ⁻¹)	% da dose recomendada (L ha ⁻¹)
1	0	0	0
2	0,125	45	6,125
3	0,25	90	12,5
4	0,50	180	25
5	1,0	360	50
6	2,0	720	100
7	4,0	1440	200
8	8,0	2880	400
9	16,0	5760	800
10*	32,0	11520	1600

* Este tratamento não foi utilizado na instalação do estudo preliminar.



Figura 2. Detalhes do estágio de desenvolvimento das plantas no momento da aplicação e do equipamento e da aplicação dos tratamentos.

5.1 Estudo Preliminar

Foi realizado um experimento com uma população de *Conyza* spp. presente na área experimental da Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp em Botucatu/SP, onde foi observada grande falha de controle das plantas após aplicações consecutivas de glyphosate na área. As sementes foram coletadas em plantas que sobreviveram à aplicação de glyphosate e armazenadas para condução do experimento, conforme já descrito. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com nove tratamentos e quatro repetições. Cada vaso contendo uma planta foi considerado como uma repetição.

Aos 28 dias após os tratamentos (DAT) foram realizadas avaliações visuais de controle segundo escala percentual de notas, onde “0” correspondeu a nenhuma injúria e “100” significou a morte das plantas, conforme Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (1995). Foi realizada também a medida da altura, desde a base até a inserção da última folha e a contagem do número de capítulos (inflorescências) das plantas. Em seguida foram coletados as folhas e o caule de cada planta e pesados em balança de precisão (0,001g) para determinação da biomassa fresca em cada tratamento.

As folhas foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio e congeladas em ultrafreezer a -80°C, para posterior extração e determinação dos seguintes compostos por LC-MS/MS: ácido chiquímico, ácido desidrochiquímico, fenilalanina, tirosina, triptofano e ácido salicílico. Após o congelamento das amostras, foram realizados furos no envelope de papel alumínio e as mesmas foram submetidas ao processo de liofilização utilizando-se o liofilizador Christ Alpha 2-4 LD Plus, a uma temperatura de -70°C durante 72 horas. Após a liofilização, as folhas foram maceradas em almofariz contendo nitrogênio líquido até se obter um pó homogêneo.

Após as folhas serem maceradas, pesou-se cerca de 100 mg da amostra seca em balança Shimadzu (AY220) com 0,0001g de precisão, que foram acondicionadas em tubos “falcon” de 15 mL de capacidade. Foi adicionado no tubo contendo a amostra, 10 mL de água acidificada a pH 2,5 (MATALLO, 2009), com pipeta automática Gilson. Os tubos foram agitados em vortex para que a amostra seca fosse misturada com a água e então submetidos a banho de ultra-som durante 30 minutos.

As amostras foram submetidas à centrifugação a 4000 g, durante 10 minutos a 20°C (centrífuga Rotanta 460R). O sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro

Millex HV (Millipore) 0,45 μm , com membrana durapore 13 mm, e acondicionados em vial âmbar 9mm (Flow Supply), com 2 mL de capacidade, para posterior quantificação dos compostos por LC-MS/MS. A sequência do procedimento de extração dos compostos da amostra está apresentada na Figura 3.

Foram mantidas cerca de 20 plantas em casa de vegetação para a produção de sementes que foram utilizadas para a realização do próximo estudo, com a mesma denominação de população 4 (P4).

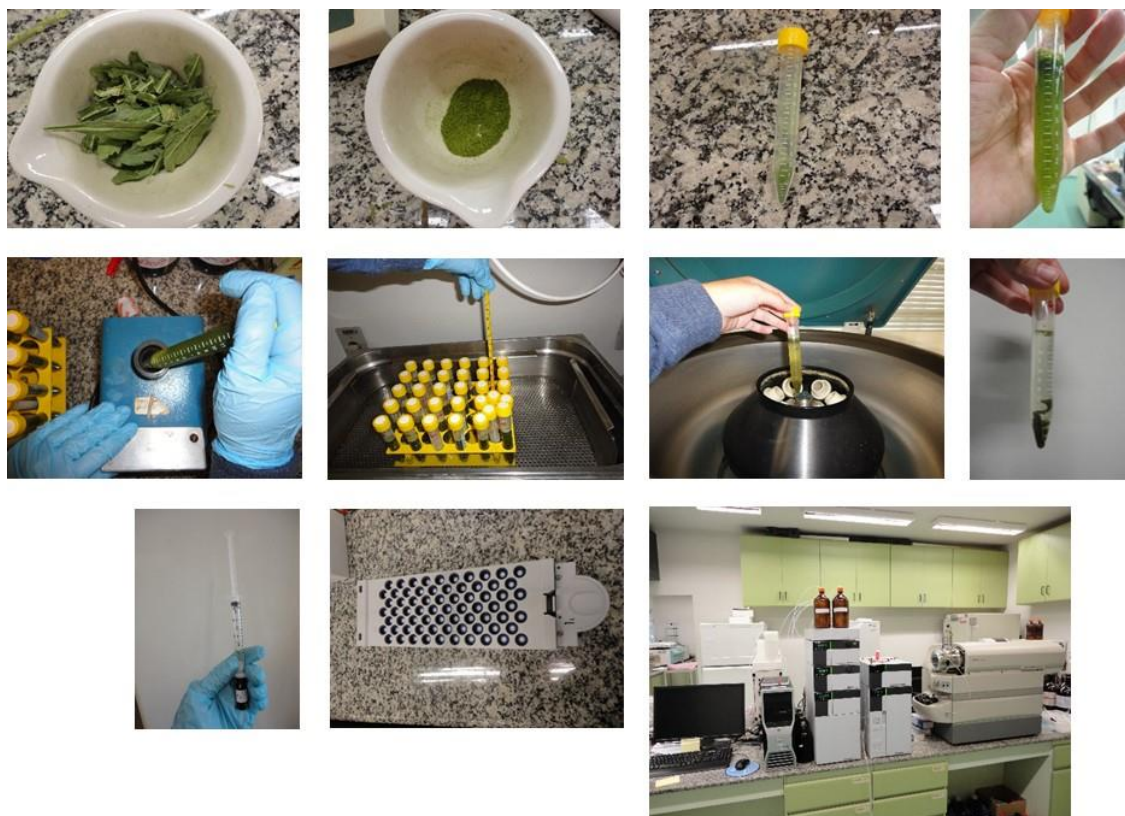


Figura 3. Procedimentos para extração dos compostos relacionados à rota do ácido chiquímico das amostras de buva (Gomes, 2011).

5.2. Estudo 1: Curvas de Dose-Resposta

Neste estudo foram realizados quatro experimentos em casa de vegetação, sendo um experimento para cada população, com delineamento inteiramente casualizado com dez tratamentos e cinco repetições. Aos 28 DAT foram realizadas avaliações visuais de controle segundo escala percentual de notas, onde “0” corresponde a nenhuma injúria e “100” significa a morte das plantas, conforme Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (1995). As plantas foram então separadas em folhas e caule e as raízes foram lavadas e as diferentes partes acondicionadas separadamente em sacos de papel e secos em estufa com circulação forçada de ar a 60°C durante cinco dias até atingirem peso constante. Em seguida foi realizada a pesagem de cada parte da planta separadamente (folhas, caule e raiz) em balança de precisão (0,001g).

5.3. Estudo 2: Determinação dos compostos relacionados à rota do ácido chiquímico e ácido abscísico (ABA)

Neste estudo foram determinadas as concentrações de alguns compostos que fazem parte da rota do ácido chiquímico nas plantas (ácido chiquímico, ácido desidrochiquímico, fenilalanina, tirosina, triptofano, ácido salicílico e ácido indolacético – IAA), o hormônio ácido abscísico (ABA), além do glyphosate e seu principal metabólito, o AMPA, nos quatro biótipos estudados. Para isso, foram conduzidos quatro experimentos separadamente, um para cada população, utilizando o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 10 tratamentos e quatro repetições. Cada vaso contendo uma planta foi considerado como uma repetição. A aplicação dos tratamentos foi realizada no momento em que as plantas apresentavam de 5 a 6 folhas verdadeiras totalmente expandidas, de acordo com método já descrito.

Aos 14 dias após os tratamentos (DAT) foi realizada a coleta de todas as folhas de cada planta (repetição). As folhas foram submetidas à lavagem em água corrente para total remoção dos resíduos de glyphosate que pudessem estar presentes na superfície das mesmas. Em seguida as folhas foram submetidas ao mesmo processo de armazenamento, liofilização e extração já descritos no experimento preliminar. Para a extração do IAA e do ABA foi utilizado método proposto por Durgbanshi et al. (2005).

Para a realização das análises foi utilizado um sistema LC-MS/MS (Figura 4), composto por um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC), Shimadzu, modelo Proeminence UFLC, que combina análise *ultra-rápida* e excelente performance de separação, com alta confiabilidade de resultados; equipado com duas bombas LC-20AD, auto-injetor SIL-20AC, degazeificador DGU-20A5, sistema controlador CBM-20A (permite a operação totalmente automatizada) e forno CTO-20AC (para controle da temperatura da coluna). Acoplado ao HPLC está o espectrômetro de massas 3200 Q TRAP (Applied Biosystems), híbrido triplo quadrupolo, onde Q1 e Q3 são utilizados como filtros de massa e Q2 é uma célula de colisão onde as moléculas intactas e fragmentos de Q1 são quebrados em fragmentos de massas menores, sendo que Q3 é definido para detectar apenas uma massa especial, que é um fragmento conhecido (filho) da molécula intacta (pai) de massa conhecida filtrada por Q1.

O modo utilizado nas análises foi o MRM. Este é o modo quantitativo padrão utilizado para metabólito alvo, tendo como principais vantagens alta sensibilidade e reprodutibilidade, baixo ruído e medição simultânea de até 100 compostos (Queiroga, 2009).



Figura 4. Cromatógrafo Líquido (Proeminence UFLC) acoplado ao espectrômetro de massas (3200 Q TRAP) – LC-MS/MS.

As condições cromatográficas utilizadas para quantificação dos compostos no modo de ionização negativo e positivo estão apresentadas nas Tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3. Condições cromatográficas utilizadas para quantificação dos compostos no modo de ionização negativo: glyphosate, AMPA, ácido chiquímico, ácido desidrochiquímico e ácido salicílico.

Coluna Analítica	Gemini 5 μ C18 110 Å (150mm x 4,6mm)
Fase móvel	Fase A (FA) = 5 mM acetato de amônio em água Fase B (FB) = 5 mM acetato de amônio em metanol
Gradiente	0 – 1 minuto = 30%FB e 70% FA 1 – 2,5 minutos = 50% FB e 50%FA 2,5 – 5 minutos = 50% FB e 50% FA 5 – 6,5 minutos = 75%FB e 25% FA 6,5 – 8,5 minutos = 75%FB e 25% FA 8,5 – 10 minutos = 90% FB e 10% FA 10 – 15 minutos = 90% FB e 10% FA 15 – 18 minutos = 30% FB e 70% FA
Fluxo	0,500 ml min ⁻¹

Tabela 4. Condições cromatográficas utilizadas para quantificação dos compostos no modo de ionização negativo: ácido indolacético (IAA) e ácido abscísico (ABA).

Coluna Analítica	Synergi 2,5 μ Fusion RP 110 Å (Phenomenex)
Fase móvel	Fase A (FA) = 1% de ácido acético em água Fase B (FB) = 1% de ácido acético em metanol
Gradiente	0 – 2 minutos = 45%FB e 55% FA 2 – 3 minutos = 45 a 95% FB e 55 a 5%FA 3 – 8 minutos = 95% FB e 5% FA 8 – 9 minutos = 45 a 95% FB e 55 a 5%FA 9 – 10 minutos = 45%FB e 55% FA
Fluxo	0,650 ml min ⁻¹

Tabela 5. Condições cromatográficas utilizadas para quantificação dos compostos no modo de ionização positivo: fenilalanina, tirosina e triptofano.

Coluna Analítica	Synergi 2,5 μ Fusion RP 110 Å
Fase móvel	Fase A (FA) = 5 mM acetato de amônio em água Fase B (FB) = 5 mM acetato de amônio em metanol
Gradiente	0 – 2 minutos = 10%FB e 90% FA 2 – 4 minutos = 40% FB e 60%FA 4 – 9 minutos = 95% FB e 5% FA 9 – 12 minutos = 95%FB e 5% FA 12 – 15 minutos = 10%FB e 90% FA 8,5 – 10 minutos = 90% FB e 10% FA 10 – 15 minutos = 90% FB e 10% FA
Fluxo	0,250 ml min ⁻¹

Para uma identificação inequívoca que permita a quantificação do composto, é necessário monitorar mais do que um íon. A utilização do LC-MS/MS possibilita o controle do íon molecular e de transições iônicas provenientes da fragmentação do mesmo, garantindo a sensibilidade e a especificidade necessárias para a quantificação dos analitos, em concentrações, por vezes vestigiais, presentes em matrizes de elevada complexidade (Queiroga, 2009). A massa molecular e os fragmentos gerados a partir de cada molécula estão apresentados na Tabela 6. O fragmento utilizado para quantificação de cada um dos compostos foi sempre o primeiro apresentado na Tabela 6, para cada composto.

A detecção e separação dos compostos foram realizadas em duas corridas, uma para o modo negativo (18 minutos), e outra para o modo positivo (15 minutos). Cada composto possui um tempo de retenção na coluna cromatográfica, sendo eles: ácido chiquímico (3,301 minutos); ácido desidrochiquímico (3,311 minutos); glyphosate (3,102 minutos), AMPA (3,219 minutos); ácido salicílico (11,09 minutos), ácido indolacético (2,44 minutos), ácido abscísico (3,77 minutos) fenilalanina (0,917 minutos); tirosina (0,799 minuto); e triptofano (1,006 minutos). As Figuras 5 a 7 apresentam exemplos de cromatogramas de padrões analíticos (125 μ g L⁻¹) dos compostos, nas condições descritas anteriormente.

Tabela 6. Massa molecular e íons secundários dos compostos analisados.

Composto	Massa Molecular	Íons Secundários (Fragmentos)
Glyphosate	169,08	63.100
		150.000
		78.900
AMPA	111,04	62.900
		78.900
		80.800
Ácido chiquímico	174,15	93.000
		111.000
Ácido desidrochiquímico	172,14	126.900
		109.000
		126.400
Fenilalanina	165,19	120.100
		103.100
		77.100
Tirosina	181,19	91.100
		136.100
		123.100
Triptofano	204,23	188.200
		146.100
		118.100
Ácido salicílico (SA)	138,12	93.000
		91.500
		64.900
Ácido indolacético (IAA)	175,187	130.0
		127.9
Ácido abscísico (ABA)	263,109	152.9
		152.5

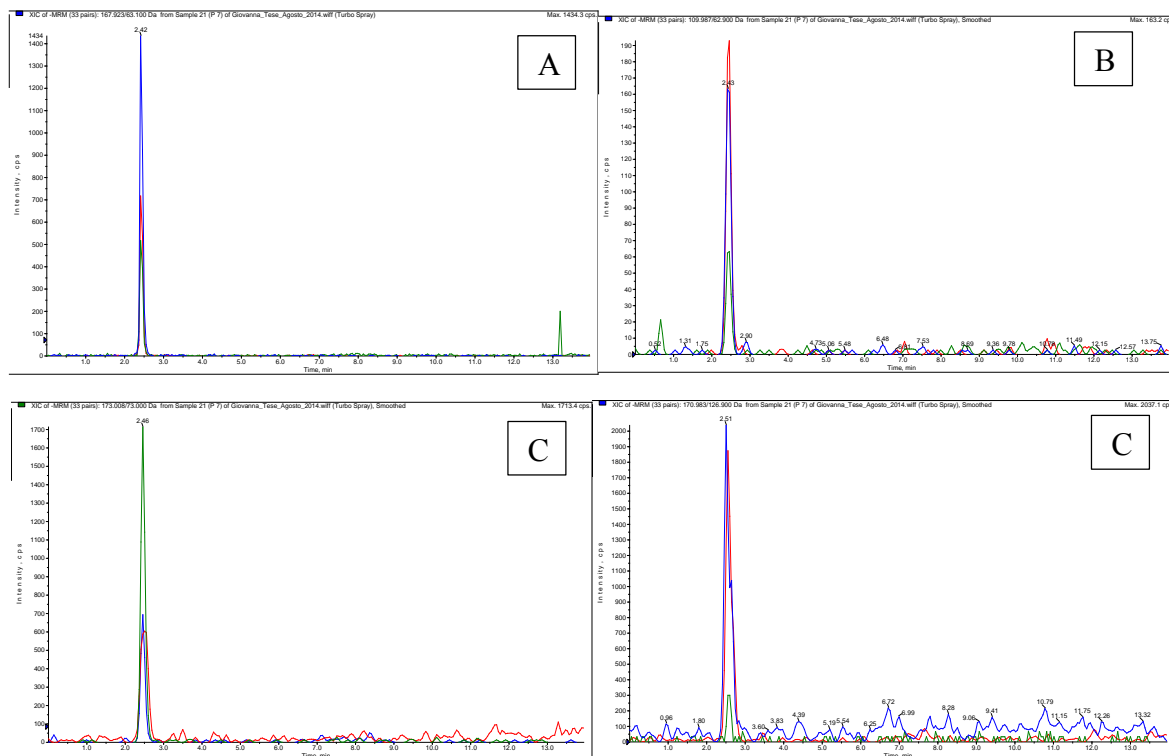


Figura 5. Cromatogramas do glyphosate [A] do ácido aminometilfosfônico (AMPA) [B], ácido chiquímico [C] e do ácido desidrochiquímico [D] e os fragmentos gerados na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$.

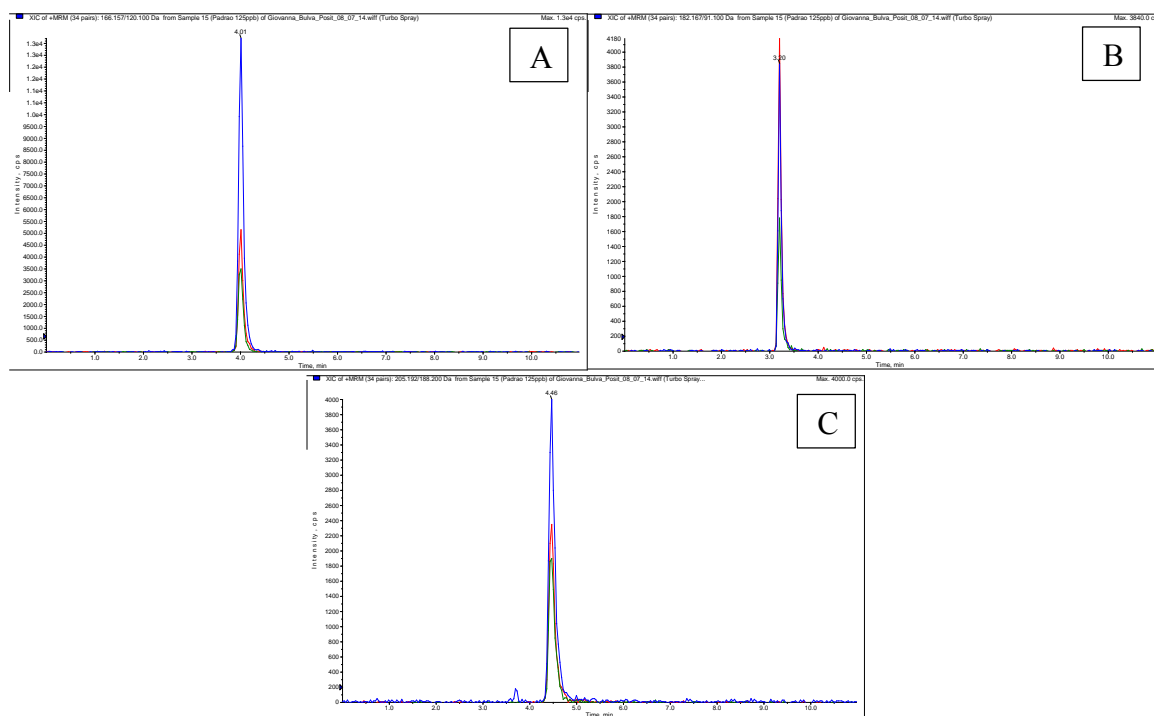


Figura 6. Cromatogramas dos três aminoácidos aromáticos, fenilalanina [A], tirosina [B] e triptofano [C], e os fragmentos gerados na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$.

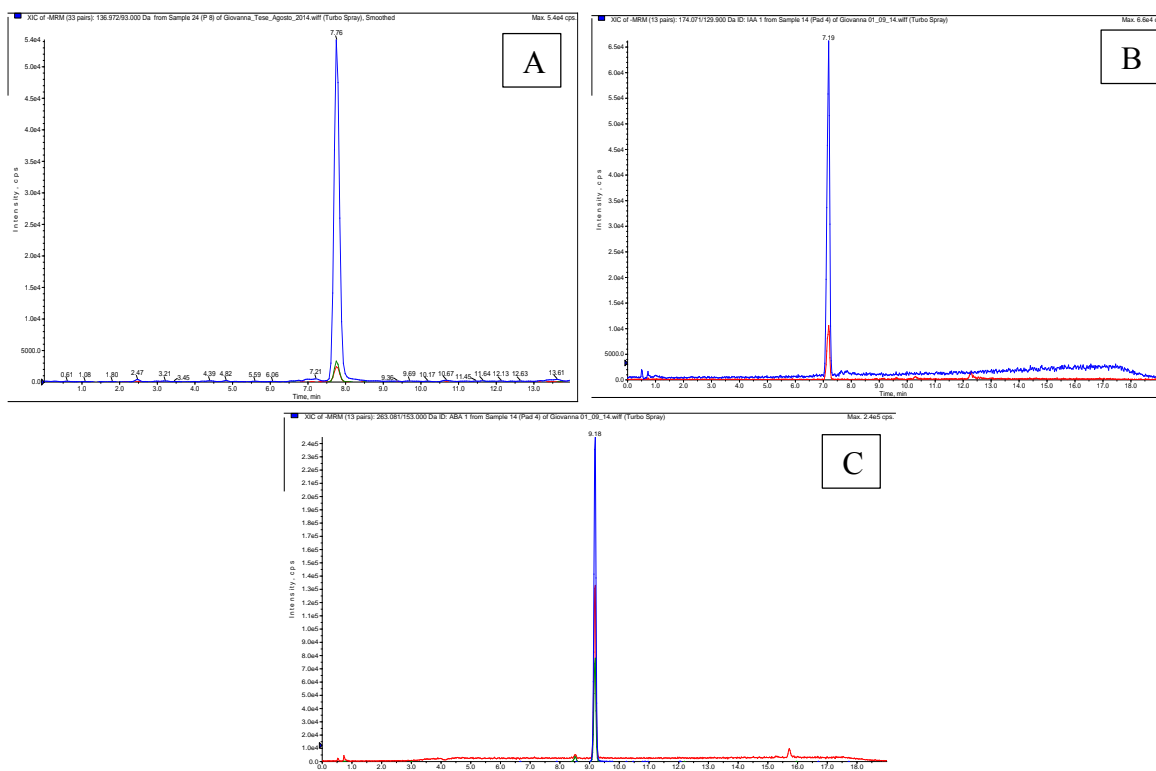


Figura 7. Cromatogramas do ácido salicílico [A], ácido indolacético [B] e ácido abscísico [C], e os fragmentos gerados na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$.

A curva analítica é a ferramenta de quantificação mais frequentemente utilizada e consiste na determinação da resposta de determinado instrumento às várias concentrações da substância em estudo (Feinberg, 2007). Segundo Gonçalves (2007), para a maioria das técnicas analíticas cromatográficas, uma relação linear de primeira ordem é observada entre a resposta do detector (y) e a concentração (x) do analito em estudo, podendo ser representada pela equação da regressão linear descrita abaixo, que deve também ter um alto coeficiente de correlação ($r > 0,9999$).

$$y = ax + b$$

Onde b é a intersecção da curva analítica e a é a inclinação da reta. As curvas analíticas para os compostos foram construídas nas faixas de concentração descritas na Tabela 7. O modelo linear utilizado nas equações mostrou-se bastante adequado.

Tabela 7. Curvas analíticas e faixas de concentração para cada composto analisado.

Composto	Equação da reta (y=ax+b)	r²	Intervalo linear (ng ml⁻¹)
Ácido chiquímico	$y = 7,9 x + 1.14^3$	0.9910	75 – 4800
Ácido desidrochiquímico	$y = 109 x + 1.06^3$	0.9879	9.38 – 600
Glyphosate	$y = 48,6 x + -8.8$	0.9969	2.34 – 600
AMPA	$y = 18,8 x + 3.26$	0.9820	4.68 – 300
Fenilalanina	$y = 791 x + 2.31^3$	0.9987	7.8125 – 1000
Tirosina	$y = 151 x + 691$	0,9984	7.8125 – 1000
Triptofano	$y = 305 x + 670$	0,9984	7.8125 – 1000
Ácido salicílico	$y = 7,32^3 x + 1.92^4$	0,9901	1.19 – 75
Ácido indolacético	$y = 15575 x + 5324$	0,9866	1 – 60
Ácido abscísico	$y = 4.4^4 x + 6110$	0,9849	1 – 60

5.4 Estudo 3: Avaliação do crescimento e produção de sementes

Foram conduzidos quatro experimentos separadamente, um para cada população, em delineamento inteiramente casualizado, com dez tratamentos e cinco repetições. O estádio de aplicação foi o mesmo utilizado para os outros experimentos, assim como os tratamentos e as condições e equipamento da aplicação.

Para as populações 1 (P1) e 2 (P2), foram realizadas três avaliações, sendo elas aos 42, 70 e 123 DAT, e aos 65 e 91 e 119 DAT, respectivamente. A população 3 (P3) foi submetida a dois períodos de avaliação, aos 113 e 127 DAT e a população 4 (P4) teve sua avaliação efetuada aos 98 DAT. Em cada período, foi realizada a medida da altura das plantas, desde a base até a inserção da última folha e foi contado o número de brotações laterais. A produção de sementes foi avaliada com base na contagem do número de capítulos abertos por planta, ou seja, aqueles que já produziram ou estão produzindo sementes; e do total de capítulos por planta, que corresponde à soma do número de capítulos (que ainda não produziram sementes) mais o número de capítulos abertos (Figura 8).

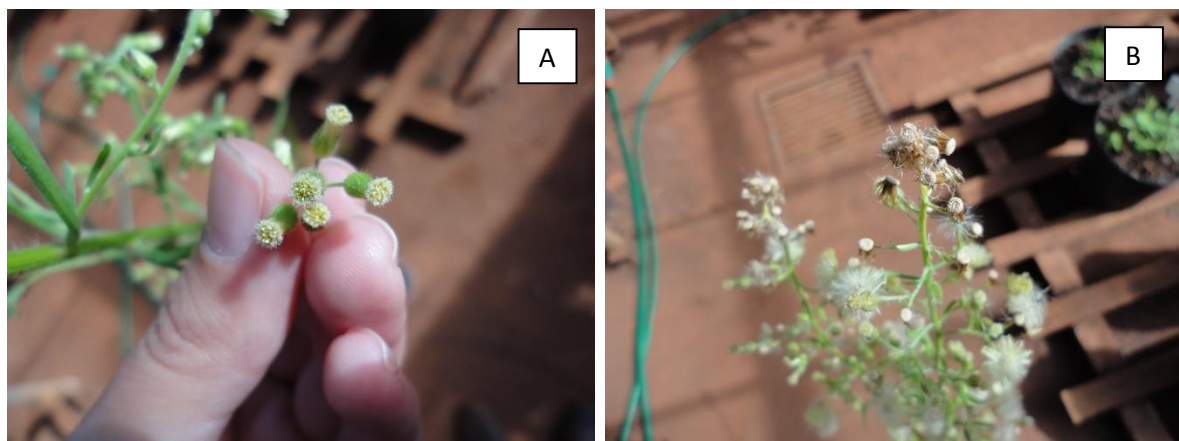


Figura 8. Detalhe dos capítulos [A] e dos capítulos abertos (já produziram sementes) [B].
Número de capítulos total corresponde à somatória dos capítulos ilustrados nas figuras A e B.

5.5. Análise dos resultados

Os dados de massa fresca e controle do estudo preliminar e de massa seca e controle do estudo 1 (curvas de dose-resposta) foram submetidos a análise de variância e aplicação do teste F. Sendo os efeitos significativos, os dados foram ajustados ao modelo de regressão não linear do tipo log-logístico proposto por Streibig et al. (1988):

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

Onde: y = porcentagem de controle; x = dose do herbicida (g e.a. ha⁻¹); a, b e c são parâmetros da equação, sendo que a = assíntota entre o ponto máximo e mínimo da variável, b = dose que proporciona 50% da assíntota (corresponde ao C₅₀ ou GR₅₀) e c = declividade da curva.

Foi ajustado o modelo de regressão não linear para os dados de altura das diferentes populações, de acordo com Carvalho et al. (2013):

$$y = y_0 + ae^{-0,5\left(\frac{x-x_0}{b}\right)^2}$$

Onde: y = característica avaliada em resposta às doses de glyphosate; y_0 = menor valor; a = diferença entre y_0 e o máximo valor de y ; x_0 = dose que promove o maior estímulo da característica; b = desvio padrão em x_0 . As análises de regressão foram realizadas com auxílio do software estatístico Sigmaplot 13.0.

Para os dados referentes aos níveis dos compostos nos tecidos foliares foi realizada a análise de variância dos dados pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste t a 5% de probabilidade. Foi calculado o erro padrão das médias de quatro repetições e plotados nos gráficos como barras horizontais. O mesmo procedimento foi realizado para os dados referentes ao número de brotações laterais e para o estudo de produção de sementes, no entanto, o erro padrão de cada média foi calculado com base em cinco repetições. Os erros padrão foram calculados no software Microsoft Excel e os gráficos foram construídos no software Sigmaplot 13.0. Foi realizada análise de correlação confrontando o número médio de inflorescências nas plantas tratadas com as doses de 45 a 350 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate e testemunhas não tratadas.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Estudo Preliminar

Os coeficientes de determinação (r^2) demonstraram um bom ajuste dos dados ao modelo proposto por Streibig et al. (1988) (Tabela 8). Esta população (P4) não apresentou 100% de controle na maior dose testada (5760 g e.a. ha⁻¹), podendo ser considerado resistente, considerando que a dose recomendada para controle desta espécie, que é de 720 g e.a. ha⁻¹. Os dados de porcentagem de massa fresca da parte aérea das plantas de *C. sumatrensis* (P4) tratadas em relação à testemunha (Figura 9), assim como a porcentagem de controle (Figura 10), foram submetidos à análise de regressão não linear e os parâmetros a , b e c estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Estimativas dos parâmetros a , b e c e o coeficiente de determinação (r^2) do modelo log-logístico para as plantas de *C. sumatrensis* (P 4) em relação à porcentagem de massa fresca e controle aos 28 DAT.

Variável	a	b (GR ₅₀ ou C ₅₀)	c	r ²
Massa fresca (%)	98,6629	1339,0457	1,1104	0,9659
Controle (%)	118,5227	3551,2810	-1,3904	0,9985

Equação do modelo: $y=a/(1+((x/b)^c))$

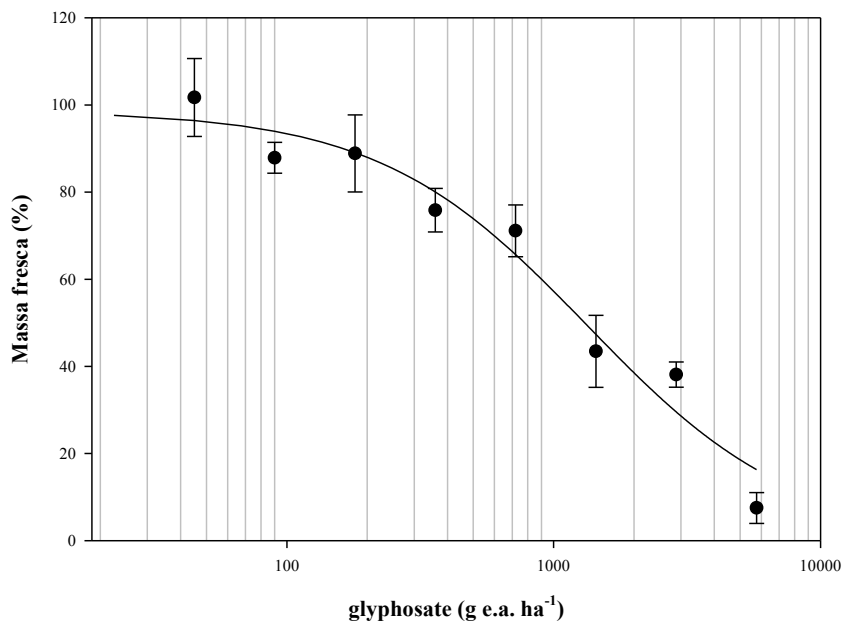


Figura 9. Curva de dose-resposta para a variável massa fresca da parte aérea (g) de *C. sumatrensis* (P4) tratadas com glyphosate aos 28 DAT.

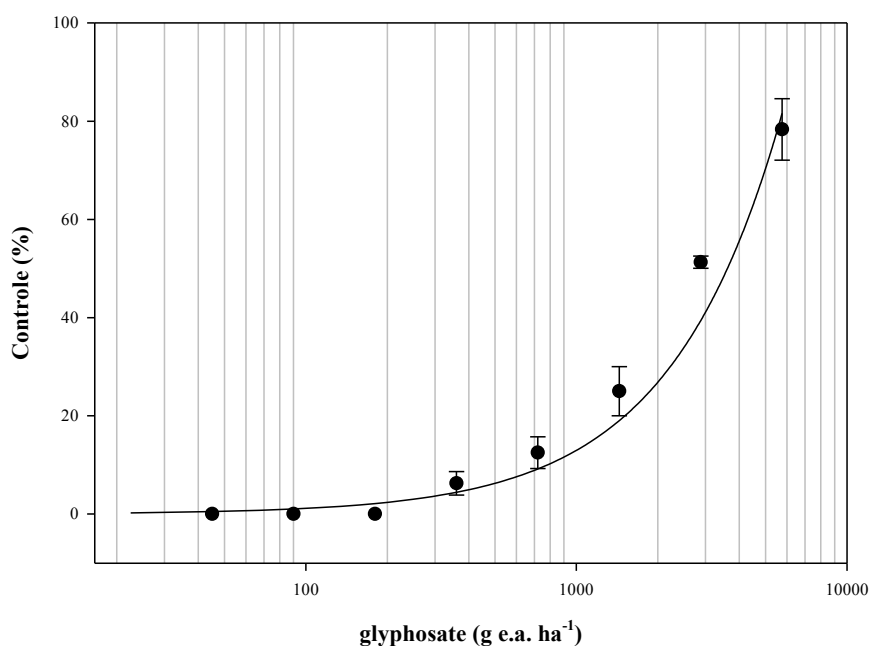


Figura 10. Curva de dose-resposta para a variável controle (%) de *C. sumatrensis*. (P4) aos 28 DAT.

Aos 28 DAT também foi realizada a medida da altura das plantas, apresentada na Figura 11. Houve um aumento na altura das plantas tratadas com glyphosate

nas doses de 45, 90 e 180 g ha⁻¹. A dose de 90 g ha⁻¹ foi a que ocasionou maior altura das plantas, com cerca de 22% de acréscimo em relação à testemunha. A partir da dose de 360 g ha⁻¹ ocorreu uma redução gradativa na altura das plantas. Diversos trabalhos evidenciaram o estímulo de crescimento de plantas submetidas a baixas doses do herbicida glyphosate (SCHANBENBERGER et al., 1999; WAGNER et al., 2003; DUKE et al., 2006; GODOY, 2007; CARBONARI et al., 2007a; CARBONARI et al., 2007b e VELINI et al., 2008). O bloqueio parcial da EPSPS, através da aplicação de baixas doses de glyphosate, implicou em estímulos ao crescimento de várias espécies vegetais, incluindo eucalipto, pinus, milho e soja (não transgênica e suscetível ao glyphosate). O estímulo de crescimento de uma planta por baixas doses de um composto tóxico é denominado “hormesis” (VELINI et al., 2010).

Embora os estímulos de crescimento das plantas relatados nos trabalhos tenham ocorrido em doses muito baixas do glyphosate, de 1,8 a 36 g e.a. ha⁻¹, o estímulo na altura das plantas observado para esta população de *C. sumatrensis* foi para a aplicação da dose de 90 g e.a. ha⁻¹ (Figura 11). Este efeito na altura das plantas em doses mais altas de glyphosate do que àquelas já relatadas para aumento de crescimento, pode ser devido ao possível mecanismo de resistência desse biótipo, que pode ter uma reduzida translocação do glyphosate pelo sequestro do mesmo no vacúolo, como já foi relatado para espécies do gênero *Conyza* (GE et al., 2010). Como o mecanismo de resistência não está relacionado ao sítio de ação, o mesmo continua ativo, mas recebe menores quantidades do herbicida, o que pode explicar o fato de doses maiores do que as usualmente encontradas em literatura terem causado este efeito “hormético”.

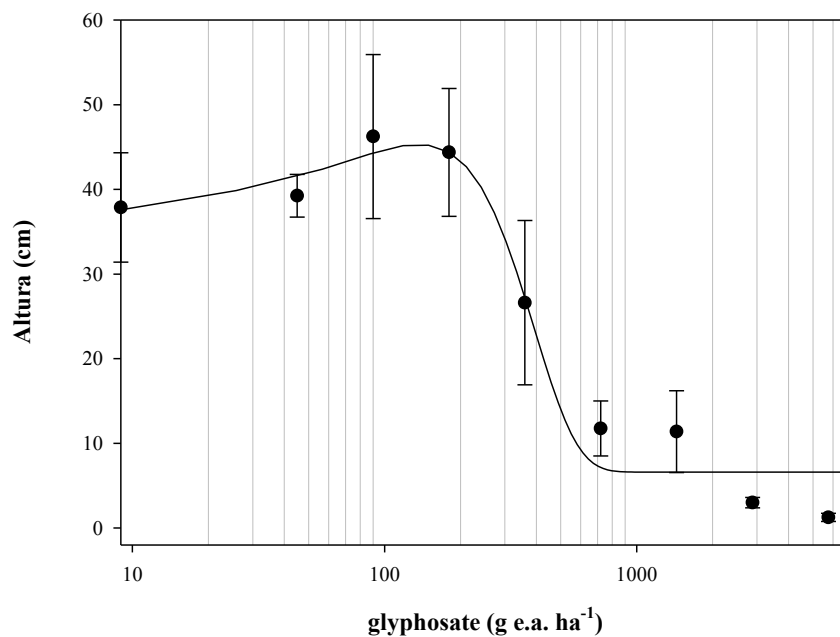


Figura 11. Altura (cm) das plantas de *C. sumatrensis*. (P4) aos 28 DAT. Equação: $y = 6,60 + 38,71 \cdot \exp(-0,5 \cdot ((x - 135,93) / 199,97)^2)$. $R^2 = 0,9635$.

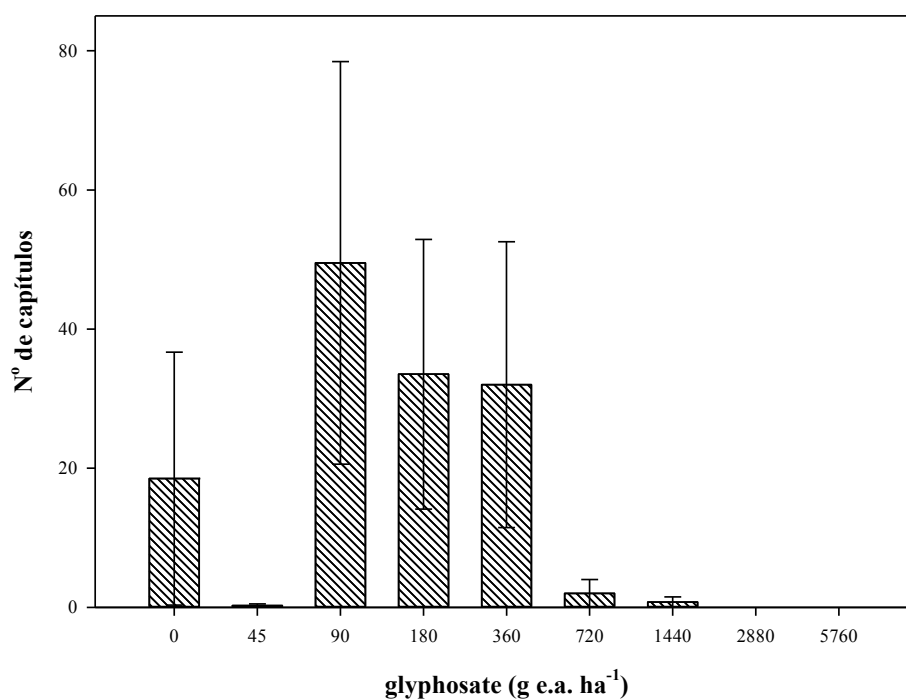


Figura 12. Número de capítulos de *C. sumatrensis*. (P4) aos 28 DAT. CV = 195,06%; $F_{\text{tratamento}} = 1,641^{\text{ns}}$; DMS = 42,92. ^{ns} não significativo.



Figura 13. Detalhe do efeito do glyphosate no aumento do crescimento e antecipação do florescimento em *C. sumatrensis* (P4) aos 28 DAT.

Nas Figuras 14 e 15 estão apresentados os níveis dos ácidos chiquímico e desidrochiquímico nas plantas de *C. sumatrensis* (P4) aos 28 DAT. Houve pequeno acúmulo desses dois compostos nos tecidos das folhas das plantas com o aumento das doses de glyphosate. Para a maior dose testada foi observado acúmulo de 1,5 e 2,0 vezes dos ácidos chiquímico e desidrochiquímico, respectivamente, com relação à testemunha. Geiger et al. (1986) observaram que o acúmulo de ácido chiquímico em folhas adultas de *Beta vulgaris* L. iniciou rapidamente, atingindo uma concentração 80 vezes maior do que a testemunha, 24 horas após a aplicação.

Com o bloqueio da enzima EPSPS pelo herbicida glyphosate, vários trabalhos demonstraram o aumento da concentração de ácido chiquímico em plantas de milho não resistentes ao glyphosate (REDDY et al., 2010), plântulas de *Brassica napus* (PETERSEN et al., 2007), folhas de ervilha (ORCARAY, 2010), folhas de *B. decumbens* e cana-de-açúcar (MATALLO et al., 2009) plantas de soja não resistentes ao glyphosate (HERNANDEZ et al., 1999), folhas jovens e maduras de *Lupinus albus* (MARÍA et al., 2006). Os elevados níveis de ácido chiquímico são utilizados como um indicador precoce e altamente sensível dos efeitos do glyphosate nos tecidos das plantas (HARRING et al., 1998). No entanto, PLINE et al. (2002) e SINGH e SHANER (1998) mostraram que plantas transgênicas resistentes ao glyphosate não acumulam grandes quantidades de ácido chiquímico após a aplicação do herbicida, desta forma não seria um indicador do efeito do herbicida nestas plantas.

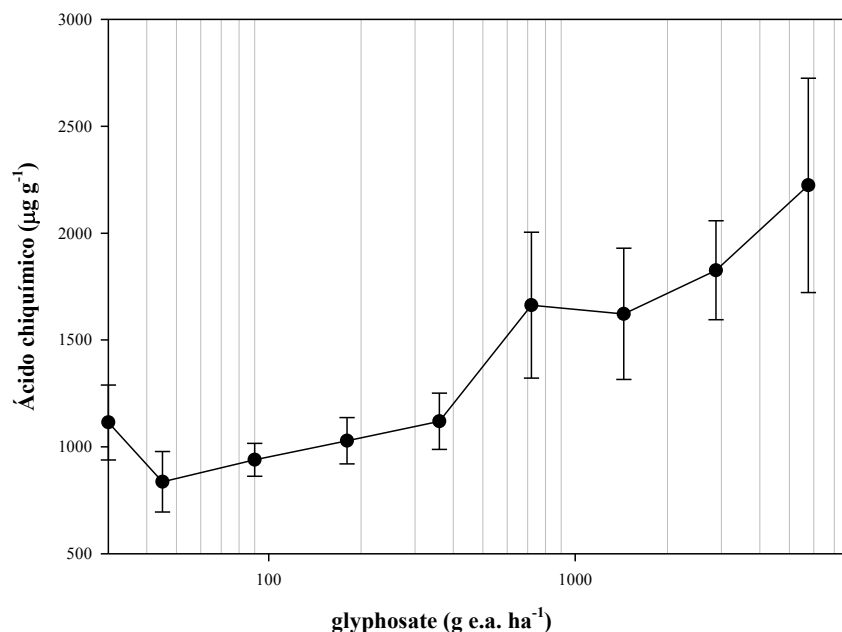


Figura 14. Concentração de ácido chiquímico ($\mu\text{g g}^{-1}$) na massa fresca de folhas de *C. sumatrensis* (P4) aos 28 DAT. CV = 40,51%; Ftratamento = 2,961**; DMS = 781,03. ** significativo a 1%.

O ácido desidrochiquímico é um composto intermediário da rota do ácido chiquímico, produzido a partir do ácido desidroquínico pela enzima desidroquinato desidratase no terceiro passo da via e em seguida é convertido a ácido chiquímico, em uma reação catalisada pela chiquimato-desidrogenase (também conhecida como chiquimato NADP⁺ oxidoreductase) (HERRMANN e WEAVER, 1999). Nos passos descritos, terceiro e quarto da rota, as enzimas que catalisam as reações são bifuncionais, e desempenham importante papel na regulação de metabólitos nos pontos de ramificação da rota para garantir a produção suficiente do composto desejado, e são encontradas no ponto de ramificação para a síntese de ácido quínico (DING et al., 2007). Os compostos desidroquinato e desidrochiquimato podem ser direcionados para o metabolismo do ácido quínico (BENTLEY, 1990). Gomes (2011) observou acúmulo dos ácidos chiquímico, quínico e desidrochiquímico em plantas de milho submetidas à dose de 720 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate em relação à testemunha.

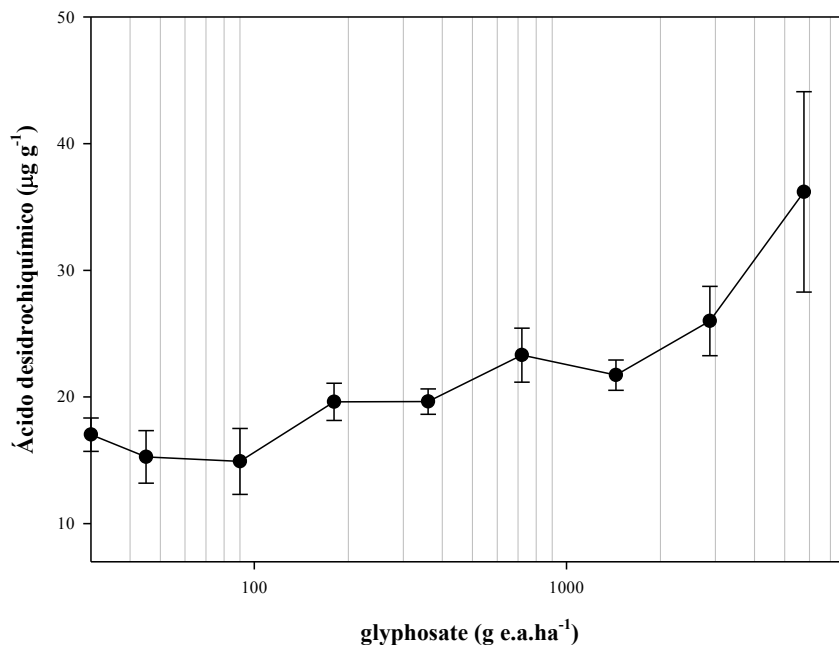


Figura 15. Concentração de ácido desidrochiquímico ($\mu\text{g g}^{-1}$) na massa seca de folhas de *Conyza sumatrensis* (P4) aos 28 DAT. CV = 27,55%; Ftratamento = 5,952**;; DMS = 8,71. ** significativo a 1%.

Na Figura 15 estão apresentados os níveis dos aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano, no tecido foliar de *C. sumatrensis* (P4) submetida à aplicação de glyphosate. Os aminoácidos fenilalanina e tirosina apresentaram comportamento semelhante, com aumento dos níveis até a dose de 1440 g ha^{-1} de glyphosate, de 2,8 e 2,9 vezes os níveis encontrados na testemunha, respectivamente. A partir desta dose houve uma queda nos níveis desses aminoácidos, embora mesmo na maior dose de glyphosate testada (5760 g ha^{-1}) as plantas ainda apresentaram maiores níveis do que a testemunha.

Petersen et al. (2007) verificaram um aumento pronunciado da concentração de fenilalanina em plantas de *B. napus* em resposta às concentrações de 1 e $10 \mu\text{M}$ de glyphosate, mas a concentração tende a decrescer, até a exposição a $50 \mu\text{M}$ de glyphosate, estando pouco abaixo da concentração encontrada na testemunha. Embora o glyphosate seja responsável pelo bloqueio da biossíntese dos aminoácidos aromáticos, os resultados observados pelos autores não revelaram um claro decréscimo no conteúdo de fenilalanina, tirosina e triptofano, quando suas concentrações em plantas expostas ao glyphosate são comparadas com as concentrações das plantas testemunhas.

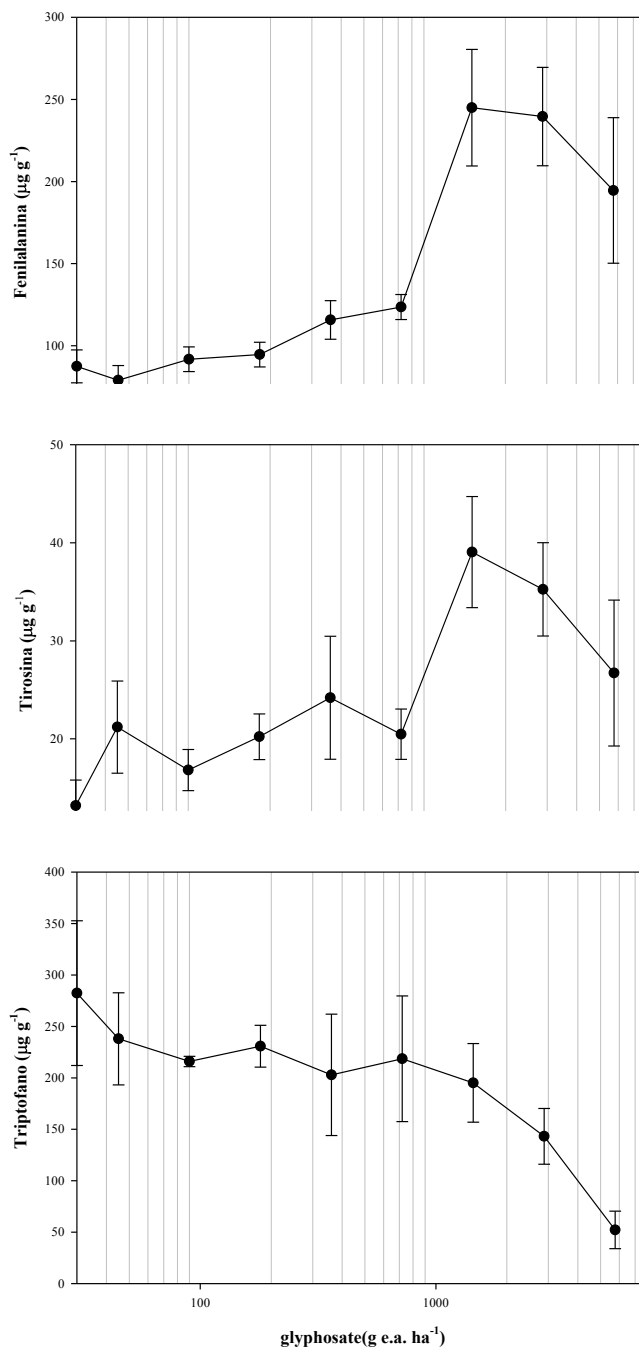


Figura 16. Concentração de fenilalanina, tirosina e triptofano ($\mu\text{g g}^{-1}$) na massa fresca de folhas de *Conyza sumatrensis* (P4) 28 DAT. Fenilalanina: CV = 31,60%; Ftratamento = 8,826**; DMS = 64,18. Tirosina: CV = 36,71%; Ftratamento = 3,595**; DMS = 12,84. Triptofano: CV = 44,02%; Ftratamento = 2,303**; DMS = 126,24. ** significativo a 1%. * significativo a 5%.

Este aumento no teor de aminoácidos observado por alguns autores (PETERSEN et al., 2007; ORCARAY et al., 2010; GRAVENA et al., 2009; WANG et al.,

2001, GOMES, 2011) pode estar relacionado com a degradação das proteínas das plantas e a conseqüente liberação dos aminoácidos que compõem a mesma. GRAVENA et al. (2009) verificaram um efeito transitório do glyphosate nos teores de aminoácidos totais, com uma redução aos 2 DAT em folhas jovens e maduras de limão cravo submetidas a diferentes doses de glyphosate, e a partir de 4 DAT um aumento dos níveis dos aminoácidos, independentemente da dose de glyphosate testada.

Os níveis de triptofano nos tecidos das folhas de *C. sumatrensis* (P4) apresentaram comportamento diferente do observado para os outros dois aminoácidos (fenilalanina e tirosina), pois não ocorreu aumento dos níveis nas plantas tratadas, com queda principalmente a partir da dose de 1440 g ha⁻¹. A aplicação de 5760 g ha⁻¹ de glyphosate ocasionou uma redução de cerca 75% nos níveis de triptofano em relação à testemunha (Figura 16).

O ácido salicílico é um composto fenólico formado na rota do ácido chiquímico e tem como um dos precursores o aminoácido fenilalanina. Os níveis de ácido salicílico encontrados seguiram o mesmo comportamento dos níveis de fenilalanina no tecido das plantas, com aumento observado na dose de 1440 g ha⁻¹ de glyphosate e posterior queda, embora mesmo assim, na maior dose (5760 g ha⁻¹) ainda foi maior do que a testemunha (Figura 17). Este composto fenólico induz o florescimento em plantas aquáticas *Lemna gibba*, *Spirodela polyrrhiza* e *Wolffia microscopica* quando essas plantas de dia longo crescem sob dias curtos com condições não indutivas de fotoperíodo. Este efeito é não específico e pode estimular o florescimento nessas e outras espécies (BUCHANNAN et al., 2000). Embora o ácido salicílico possa ter correlação com o florescimento das plantas, o aumento deste não correspondeu à dose em que foi observado o estímulo na produção de flores (Figura 17).

A partir dos resultados obtidos nestes experimentos, foram realizados novos estudos, adicionando-se uma dose mais alta de glyphosate (11520 g e.a. ha⁻¹), pois a maior dose testada não foi suficiente para proporcionar 100% de controle das plantas de *C. sumatrensis* (P4). Os próximos estudos foram realizados então com a mesma população 4 já utilizada, além de mais duas populações (P1 e P3) de *C. sumatrensis* e uma população de *C. bonariensis* (P2).

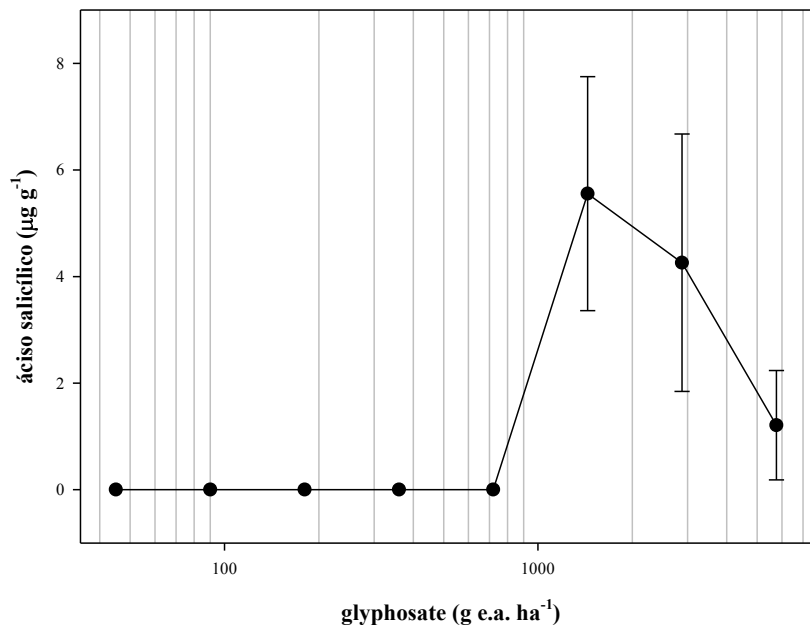


Figura 17. Concentração de ácido salicílico ($\mu\text{g g}^{-1}$) na massa seca de folhas de *Conyza sumatrensis* (P4) aos 28 DAT. CV = 191,57%; Ftratamento = 3,930**; DMS = 3,16. ** significativo a 1%.

6.2. Estudo 1: Curvas de Dose-Resposta

Os dados de porcentagem de massa seca da parte aérea (folhas + caule) e sistema radicular em relação à testemunha não tratada e também de porcentagem de controle ajustaram-se ao modelo log-logístico proposto por Streibig et al. (1988), com coeficientes de determinação (r^2) igual ou acima de 0,91 para todas as variáveis e biótipos. Os coeficientes de determinação e os parâmetros a , b e c do modelo estão apresentados na Tabela 9.

A população de *C. bonariensis* (P2) apresentou drástica redução de massa seca tanto da parte aérea como do sistema radicular já na primeira dose de glyphosate testada ($45 \text{ g e.a. ha}^{-1}$), evidenciando uma grande suscetibilidade da mesma ao herbicida, com GR_{50} de cerca de 35 e 37 g ha^{-1} , respectivamente (Figuras 18 e 19). As populações de *C. sumatrensis* apresentaram comportamento semelhante entre si com relação à massa seca da parte aérea e sistema radicular, com GR_{50} para as duas variáveis muito superiores do que àquelas encontradas para a população 2 (*C. bonariensis*).

Tabela 9. Estimativas dos parâmetros a , b e c e o coeficiente de determinação (r^2) do modelo log-logístico para as plantas de *C. sumatrensis* (P1, P3 e P4) e *C. bonariensis* (P2) em relação à porcentagem de massa seca da parte aérea (PA) e do sistema radicular (SR) e controle aos 28 DAT.

<i>Conyza sumatrensis</i> (P1)				
Variável	a	b (GR ₅₀ ou C ₅₀)	c	r ²
Massa seca PA (%)	88,9581	660,8327	1,2506	0,9621
Massa seca SR (%)	96,1514	163,7413	0,7923	0,9190
Controle (%)	97,8827	519,8751	-1,3882	0,9928
<i>Conyza bonariensis</i> (P2)				
Variável	a	b (GR ₅₀ ou C ₅₀)	c	r ²
Massa seca PA (%)	100,0712	34,8875	1,0879	0,9952
Massa seca SR (%)	99,7596	36,9229	1,3016	0,9875
Controle (%)	103,0460	88,4696	-0,9217	0,9907
<i>Conyza sumatrensis</i> (P3)				
Variável	a	b (GR ₅₀ ou C ₅₀)	c	r ²
Massa seca PA (%)	99,4385	287,9415	0,7955	0,9860
Massa seca SR (%)	99,3022	129,8508	0,8540	0,9844
Controle (%)	109,3935	872,9806	-1,0351	0,9733
<i>Conyza sumatrensis</i> (P4)				
Variável	a	b (GR ₅₀ ou C ₅₀)	c	r ²
Massa seca PA (%)	99,7933	293,4113	1,0034	0,9944
Massa seca SR (%)	96,6628	342,4659	1,1657	0,9899
Controle (%)	110,7501	951,4454	-0,9523	0,9847

Equação do modelo: $y=a/(1+((x/b)^c))$

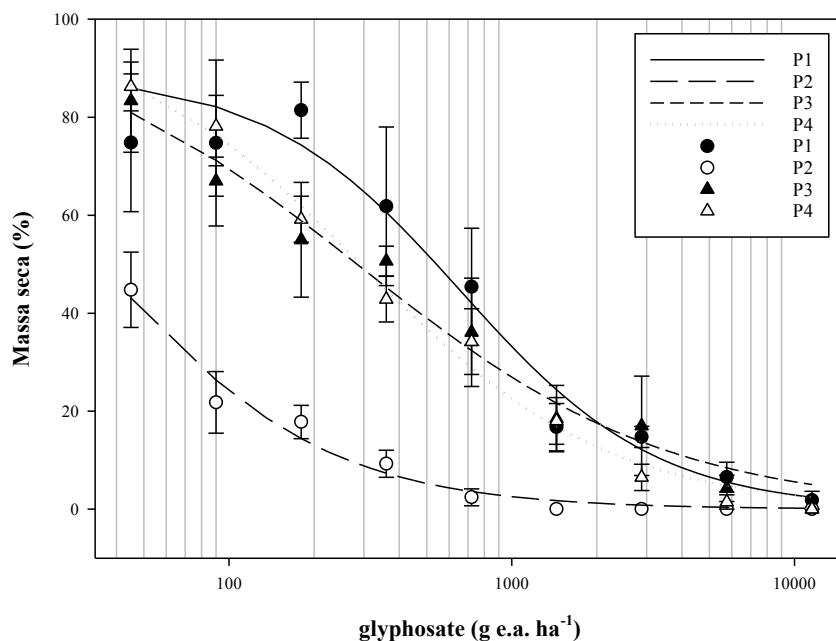


Figura 18. Curva de dose-resposta para a variável massa seca da parte aérea (g) de *C. sumatrensis* (P1, P3 e P4) e de *C. bonariensis* (P2) tratadas com glyphosate aos 28 DAT.

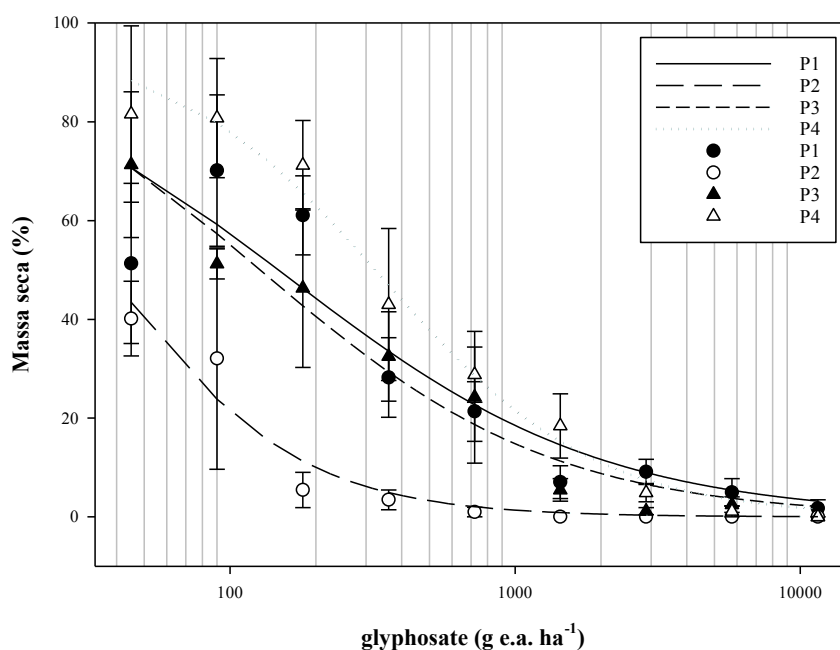


Figura 19. Curva de dose-resposta para a variável massa seca do sistema radicular (g) de *C. sumatrensis* (P1, P3 e P4) e de *C. bonariensis* (P2) tratadas com glyphosate aos 28 DAT.

A porcentagem de controle das populações de *C. sumatrensis* foi similar entre elas, e a dose recomendada de glyphosate para esta espécie não foi suficiente para controlar as plantas das populações 1, 3 e 4, sendo que a dose satisfatória para proporcionar um controle maior do que do que 80% das plantas foi cerca de 2880 g ha⁻¹, ou seja, quatro vezes maior do que a recomendada. Sendo assim, a população de *C. bonariensis* (P2) pode ser considerada suscetível e as populações de *C. sumatrensis* (P1, P3 e P4), resistentes ao glyphosate (Figura 20).

As diferentes espécies de *Conyza* spp. possuem sensibilidade diferencial ao glyphosate, o que foi demonstrada por González-Torralva et al. (2010) que estudou as três espécies com maior ocorrência no mundo em condições de casa de vegetação e concluiu que *C. bonariensis* e *C. canadensis* foram 5,4 e 12 vezes mais tolerantes, respectivamente, ao glyphosate do que a *C. sumatrensis*, contudo as três espécies exibiram uma alta sensibilidade ao glyphosate no estágio de roseta. As plantas de *C. sumatrensis* apresentaram um C₅₀ de 2,9, seguido por *C. bonariensis* com C₅₀ de 15,7 e *C. canadensis* de 34,9 g e.a. ha⁻¹. A população de *C. bonariensis* (P2) utilizada apresentou um C₅₀ de 88,4 g e.a. ha⁻¹, maior do que o apresentado por González-Torralva et al. (2010) para a mesma espécie.

A população de *C. sumatrensis* (P4) utilizada nos experimentos do estudo preliminar apresentou GR₅₀ e C₅₀ de 1339 e 3552 g ha⁻¹ de glyphosate, respectivamente. No entanto, a primeira geração de plantas desta população (P4) foi utilizada neste estudo e apresentou um nível de resistência bem mais baixo do que as plantas mãe, com GR₅₀ e C₅₀ de 293 e 951 g ha⁻¹ de glyphosate. Esta redução no nível de resistência das plantas pode estar relacionada com a redução da temperatura ambiente na execução deste experimento, que foi instalado no mês de junho, enquanto que o preliminar foi instalado no mês de dezembro, com temperaturas mais altas, o que pode reduzir o sequestro de glyphosate para o vacúolo, como observado por Ge et al. (2011) em *C. canadensis*.

O pronto transporte do glyphosate através do tonoplasto em *C. canadensis* resistente ao glyphosate sugere fortemente que seja feito por uma bomba de membrana presente no tonoplasto (GE et al., 2010). Os transportadores ABC são comuns no genoma da planta e requerem ATP para funcionarem e transportar uma variedade de pequenas moléculas através da membrana (REA, 2007; VERRIER et al., 2009). Ge et al. (2011) observaram sob condições de temperatura mais alta, que 85% do total de glyphosate detectado foi sequestrado no vacúolo em *C. canadensis* resistente comparada com 15% na

suscetível. Os autores afirmam que embora ambos os biótipos possuem a capacidade de transportar o glyphosate através da membrana do tonoplasto, o processo é mais eficiente em plantas resistentes. Já o ambiente mais frio suprimiu fortemente a eficiência normal do sequestro do glyphosate no vacúolo da *C. canadensis* resistente, no entanto, parece não restringir severamente a entrada dentro das células da planta (GE et al., 2011).

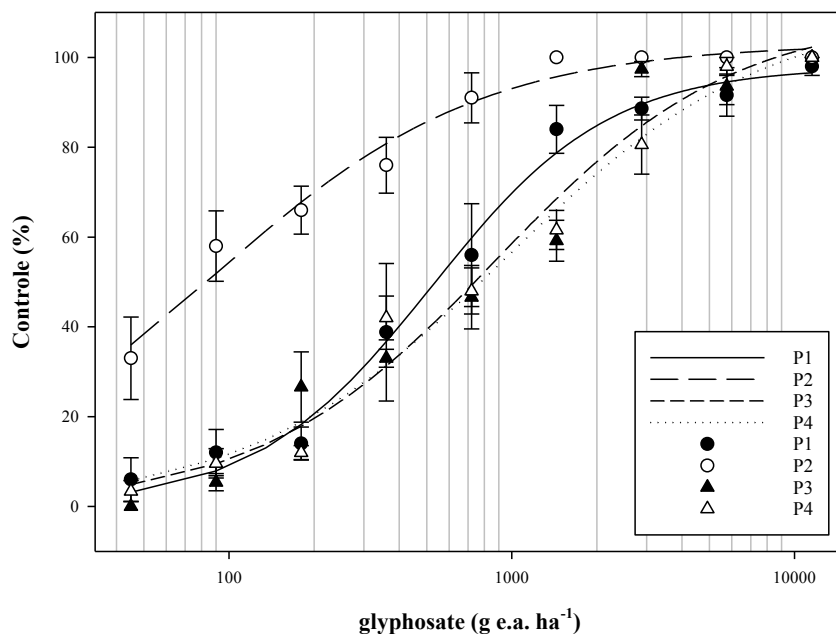


Figura 20. Curva de dose-resposta para a variável controle (%) de *C. sumatrensis* (P1, P3 e P4) e de *C. bonariensis* (P2) tratadas com glyphosate aos 28 DAT.

6.3. Estudo 2: Determinação dos compostos relacionados à rota do ácido chiquímico e ácido abscísico (ABA)

A análise de variância dos dados e a diferença mínima significativa entre as médias de cada um dos compostos analisados para cada população de *Conyza* spp. testadas estão apresentados na Tabela 10. Nas Figuras 21 e 22 estão apresentados os níveis de glyphosate e AMPA no interior dos tecidos das folhas, ou seja, somente o que foi absorvido, pois as folhas foram lavadas antes da execução das análises para que todo conteúdo desses dois compostos fosse retirado da superfície foliar.

Tabela 10. Análise de variância e valores de diferença mínima significativa (DMS) para os compostos estudados para as quatro populações de *Conyza* spp..

Compostos		Populações de <i>Conyza</i> spp.			
		P1	P2	P3	P4
glyphosate	CV(%)	80,59	46,35	47,63	38,37
	F	21,943**	46,809**	56,200**	85,955**
	DMS	20,19	16,75	25,43	19,14
AMPA	CV(%)	288,45	96,95	97,99	58,83
	F	3,114**	15,160**	14,529**	41,598**
	DMS	1,26	0,85	1,37	0,70
Ácido chiquímico	CV(%)	75	50,65	58,15	66,95
	F	3,793**	9,853**	8,179**	19,962**
	DMS	173,99	1671,38	831,80	957,07
Ácido desidrochiquímico	CV(%)	115,58	86,02	104,94	134,84
	F	2,355**	6,754**	8,211**	7,826**
	DMS	17,12	246,17	107,19	92,28
Fenilalanina	CV(%)	40,11	37,03	28,23	44,80
	F	3,696**	3,004**	10,882**	13,390**
	DMS	116,24	201,04	284,25	130,15
Tirosina	CV(%)	55,48	41,36	39,81	73,47
	F	5,321**	9,988**	9,579**	12,404**
	DMS	24,80	52,16	26,21	38,10
Triptofano	CV(%)	41,09	77,11	40,45	85,81
	F	0,861 ^{ns}	3,138*	8,358**	4,155**
	DMS	46,70	1533,65	121,88	51,53
Ácido salicílico	CV(%)	146,46	99,64	74,11	123,60
	F	0,711 ^{ns}	1,878 ^{ns}	3,043**	1,633 ^{ns}
	DMS	5,85	1,36	0,74	0,26
Ácido idolacético	CV(%)	33,40	75,66	89,20	26,12
	F	16,220**	4,360**	4,614**	3,913**
	DMS	67,72	327,87	127,93	12,91
Ácido abscísico	CV(%)	41,39	67,41	75,35	34,30
	F	0,954 ^{ns}	4,120**	6,612**	5,239**
	DMS	148,10	351,58	466,31	87,47

Para a população 2 (*C. bonariensis*) foram apresentados os dados até a concentração de 1440 g ha⁻¹ de glyphosate aplicado e para as demais populações (*C. sumatrensis*) até a dose de 2880 g ha⁻¹ de glyphosate, pois a partir destas as plantas não apresentaram tecido verde suficiente para a execução das análises.

Os teores de glyphosate nas plantas aumentaram de acordo com o aumento da dose do produto aplicado. No entanto, observa-se maiores concentrações do herbicida na população 2 que é suscetível, um nível intermediário para as populações 3 e 4, enquanto que a população 1 foi a que apresentou as menores concentrações de glyphosate aos 14 DAT. Os maiores teores de glyphosate na população 2 (*C. bonariensis*), sobretudo nas menores doses do herbicida, podem justificar a maior suscetibilidade das plantas desta população ao glyphosate. (Figura 21). Não foram encontradas diferenças significativas na absorção foliar do [14C]-glyphosate entre as três espécies de *Conyza* spp. no estudo de González-Torralva et al. (2010), entretanto, a penetração foi maior em *C. sumatrensis* do que em *C. bonariensis* e *C. canadensis* sensíveis ao glyphosate.

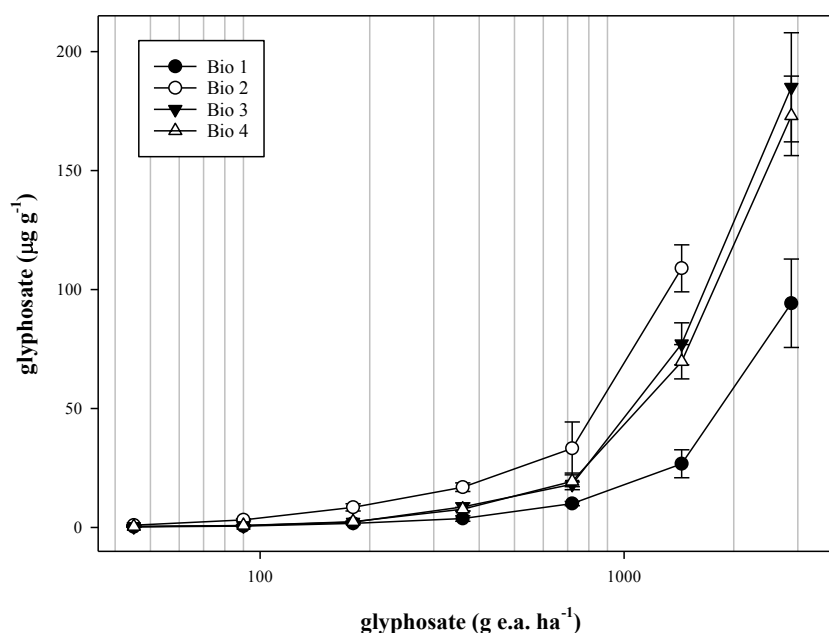


Figura 21. Concentração de glyphosate ($\mu\text{g g}^{-1}$) na massa seca (liofilizada) de folhas de *C. sumatrensis* (P1, P3 e P4) e de *C. bonariensis* (P2) tratadas com glyphosate aos 14 DAT.

A concentração de AMPA nas folhas, o principal metabólito do glyphosate, segue o mesmo comportamento, evidenciando a presença deste composto no

interior do tecido das plantas após a aplicação do herbicida (Figura 22). A detecção do AMPA em folhas, caules e sementes de várias culturas, incluindo a soja resistente ao glyphosate, após a aplicação do mesmo, sugere que a glyphosate oxidoreductase (GOX) ou um tipo de enzima similar, catalise esta reação (REDDY et al., 2008; REDDY et al., 2004; DUKE et al., 2003; ARREGUI et al., 2003). Reddy et al. (2004) detectaram 8 μg de AMPA por grama de tecido de soja resistente ao glyphosate, sete dias após a aplicação do mesmo em uma dose de 6,72 kg ha^{-1} . É possível também que os níveis de AMPA encontrados nas folhas das populações de *Conyza* spp., ocorram pela absorção do metabólito presente na superfície das folhas, decorrente da degradação microbiana do glyphosate, hipótese levantada por Reddy et al. (2008).

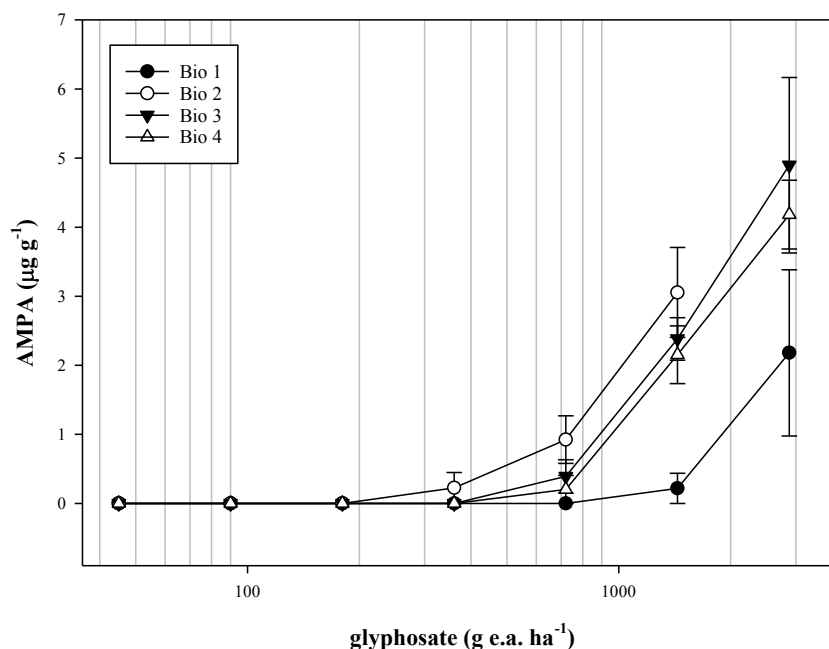


Figura 22. Concentração de AMPA ($\mu\text{g g}^{-1}$) na massa seca (liofilizada) de folhas de *C. sumatrensis* (P1, P3 e P4) e de *C. bonariensis* (P2) tratadas com glyphosate aos 14 DAT.

Pesquisadores relataram a ocorrência de duas espécies de plantas daninhas resistentes ao glyphosate pelo aumento do metabolismo do herbicida nestas plantas, sendo elas: *Digitaria insularis* (CARVALHO et al., 2011) e *C. canadensis* (GONZALEZ-TORRALVA et al., 2012), mas este não parece ser o mecanismo de resistência das populações resistentes utilizadas neste estudo, pois as mesmas não apresentam aumento do metabolismo do glyphosate a AMPA, uma vez que mantém os níveis

de AMPA nas mesmas proporções que os níveis de glyphosate encontrados nas plantas resistentes e também na suscetível. González-Torralva et al. (2012) sugeriram que o biótipo resistente de *C. canadensis* testado possui um metabolismo mais forte e rápido do que o biótipo suscetível, transformando glyphosate em seus metabólitos AMPA, glioxilato e sarcosina, e então reduzindo a quantidade de glyphosate intracelular que alcança a enzima alvo (EPSPS). Também merece destaque o fato dos teores de AMPA terem sido muito inferiores aos teores de glyphosate, indicando que em todas as populações avaliadas (resistentes ou suscetível) a metabolização do glyphosate foi pouco intensa.

Os níveis dos ácidos chiquímico e desidrochiquímico nas plantas apresentaram comportamento semelhante ao observado pela absorção de glyphosate (Figuras 23 e 24). A população 2 (*C. bonariensis*) que é suscetível, apresentou acúmulo de ácido chiquímico mesmo nas menores doses, sendo que na dose de 1440 g ha⁻¹ de glyphosate, as plantas apresentaram um acúmulo de 25 vezes em relação à testemunha. Na população 1 (*C. sumatrensis*) praticamente não ocorreu acúmulo do ácido chiquímico nas folhas tratadas com glyphosate, somente um aumento bem menor do que a população sensível, de apenas 4 vezes em relação à testemunha na dose de 2880 g ha⁻¹ de glyphosate. Esse resultado evidencia a característica de resistência desta população com o acúmulo muito discreto de ácido chiquímico apenas em dose muito alta de glyphosate.

Reddy et al. (2008) encontraram níveis de ácido chiquímico em onze espécies de plantas não tratadas com glyphosate que variaram de 2 a 904 µg g⁻¹ de tecido. Nas mesmas plantas tratadas com o glyphosate foram observados altos níveis de chiquimato, com exceção da soja resistente ao glyphosate e do milho resistente e suscetível ao herbicida. Os valores variaram de 53 µg g⁻¹ em soja resistente ao glyphosate a 16530 µg g⁻¹ em tecidos de caupi. Nandula et al. (2007) testando o efeito do glyphosate no acúmulo de ácido chiquímico em folhas de três variedades de soja resistentes ao herbicida, verificaram que não houveram diferenças significativas nos níveis de chiquimato entre as variedades, com valores que variaram de 113 a 151 µg g⁻¹ de tecido.

As populações 3 e 4 (*C. sumatrensis*) apresentaram comportamento intermediário, com acúmulo significativo de ácido chiquímico somente a partir da dose de 720 e 360 g ha⁻¹ de glyphosate, respectivamente. Mueller et al. (2003) verificaram acúmulo significativo de ácido chiquímico maiores do que os níveis iniciais após o tratamento com glyphosate tanto em *C. canadensis* resistente como na suscetível ao herbicida, e não houve

diferença significativa nos níveis de ácido chiquímico entre as populações resistentes e suscetíveis aos 2 e 4 DAT.

Mudanças nos níveis de ácido chiquímico nas plantas são especificamente o resultado da inibição da EPSPS (AMRHEIN et al., 1980), e tem sido utilizado como biomarcador da sensibilidade da EPSPS em plantas ao glyphosate (MULLER et al., 2003). Comparativamente, uma espécie com um baixo acúmulo de ácido chiquímico requer um alto nível de glyphosate para ser letal. As concentrações de ácido chiquímico nos tecidos foliares aumentaram em todas as espécies de *Conyza* spp. testadas por González-Torralva et al. (2010) após a exposição ao glyphosate, com quantidades similares entre *C. sumatrensis* e *C. bonariensis* sensíveis ao herbicida, enquanto a *C. canadensis*, que apresentou um C_{50} maior do que das outras das espécies, o acúmulo de ácido chiquímico foi menor.

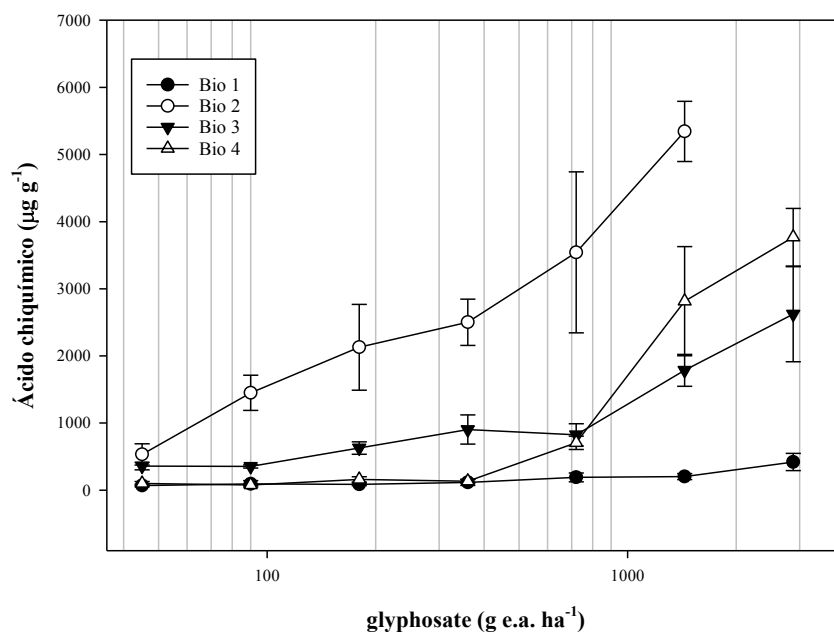


Figura 23. Concentração de ácido chiquímico ($\mu\text{g g}^{-1}$) na massa seca (liofilizada) de folhas de *C. sumatrensis* (P1, P3 e P4) e de *C. bonariensis* (P2) tratadas com glyphosate aos 14 DAT.

O acúmulo de ácido desidrochiquímico na população suscetível (P2) foi maior do que o ácido chiquímico, sendo 80 vezes maior nas plantas que foram submetidas à concentração de 1440 g ha^{-1} de glyphosate do que a testemunha. Para a população 1 (*C. sumatrensis*) novamente foi observado um discreto aumento somente na maior dose, e as

populações 3 e 4 apresentaram acúmulo deste composto somente a partir da dose de 720 g ha⁻¹ (Figura 24).

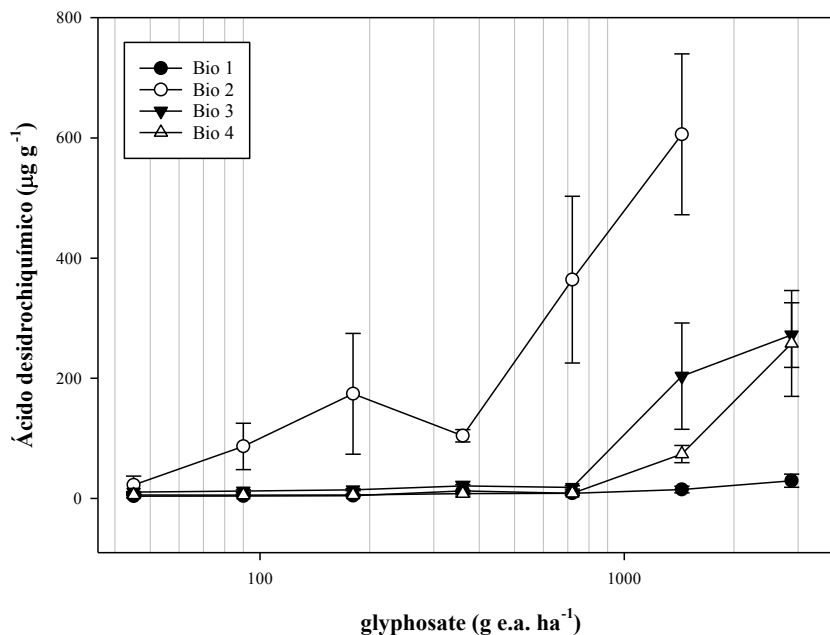


Figura 24. Concentração de ácido desidrochiquímico ($\mu\text{g g}^{-1}$) na massa seca (liofilizada) de folhas de *C. sumatrensis* (P1, P3 e P4) e de *C. bonariensis* (Bio P2) tratadas com glyphosate aos 14 DAT.

Os níveis dos três aminoácidos aromáticos para as quatro populações de *Conyza* spp. estudadas, estão apresentados na Figura 25. O comportamento dos aminoácidos fenilalanina e tirosina com relação às doses de glyphosate foram semelhantes nas populações, embora os níveis de fenilalanina sejam maiores do que os níveis de tirosina nas folhas. A população 2 (*C. bonariensis*) apresentou oscilações nas concentrações dos dois aminoácidos em relação ao aumento das doses de glyphosate, com aumentos dos níveis nas doses de 90 e 360 g ha⁻¹. Mesmo na dose de 1440 g ha⁻¹ de glyphosate, esta população não apresentou redução significativa nos níveis destes dois aminoácidos. Houve aumento nos níveis de triptofano nos tecidos desta população tratada com glyphosate, principalmente na dose de 1440 g ha⁻¹, cerca de 13 vezes maior do que a testemunha.

As populações de *C. sumatrensis* apresentaram comportamento similar quanto aos teores de fenilalanina e tirosina, com aumento dos níveis destes aminoácidos em função das doses crescentes de glyphosate. A população 4 foi a que apresentou maiores aumentos nos níveis de fenilalanina e tirosina, sendo cerca de 7 e 23

vezes maiores do que a testemunha, respectivamente. Nesta mesma população, o aumento dos níveis de triptofano também ocorreram, sendo cerca de 4 vezes maior do que a testemunha. A aplicação de glyphosate não causou nenhum efeito nos níveis de triptofano na população 1 e na população 3 houve acúmulo até a dose de 1440 g ha⁻¹, seguido de uma queda na dose de 2880 g ha⁻¹, embora sendo ainda maiores do que os níveis encontrados na testemunha.

A população 4 (*C. sumatrensis*) apresentou o mesmo comportamento observado no experimento preliminar, com aumento dos níveis de fenilalanina e tirosina com o aumento das doses de glyphosate. No entanto, os níveis de triptofano aumentaram nas plantas tratadas com relação à testemunha, o que não ocorreu no experimento preliminar. Esses aumentos nos níveis dos aminoácidos podem estar relacionados com a degradação de proteínas nas plantas expostas ao glyphosate, assim como já mencionado no experimento preliminar.

Os três aminoácidos aromáticos são formados a partir do corismato, que corresponde ao primeiro ponto de ramificação da rota do ácido chiquímico, que é convertido em arogenato pela enzima corismato mutase, e em antranilato, reação catalisada pela enzima antranilato sintase (BUCHANNAN et al., 2000). A tirosina e a fenilalanina são formadas a partir de um mesmo precursor, que é o arogenato, já o triptofano é formado a partir do antranilato. O comportamento similar dos níveis de fenilalanina e tirosina podem estar relacionados com a formação desses aminoácidos a partir de um mesmo precursor.

Os níveis de fenilalanina correlacionaram-se fortemente com os níveis de tirosina, e medianamente com os níveis de triptofano em trabalho realizado por Gomes (2011) em plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito. Segundo Petersen et al. (2007), há uma tendência semelhante no desenvolvimento de fenilalanina e tirosina em plântulas de *B. napus*, onde o aumento da concentração na menor exposição ao glyphosate (1 e 10 µM) é seguido por uma diminuição na concentração em exposições a altas concentrações do herbicida (20 a 50 µM).

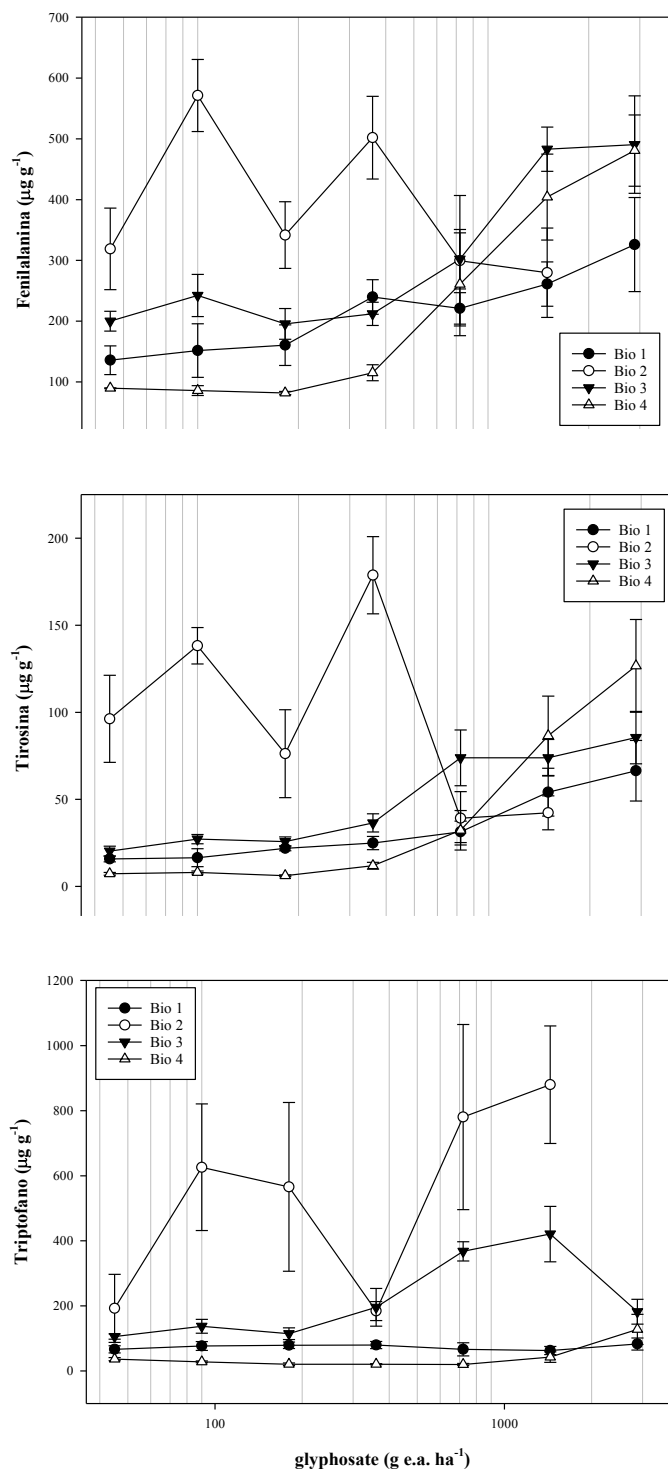


Figura 25. Concentração de fenilalanina, tirosina e triptofano ($\mu\text{g g}^{-1}$) na massa seca (liofilizada) de folhas de *C. sumatrensis* (P1, P3 e P4) e de *C. bonariensis* (P2) tratadas com glyphosate aos 14 DAT.

Os três aminoácidos aromáticos são precursores de uma grande variedade de metabólitos secundários de plantas (DEWICK, 1998). Os intermediários da rota do ácido chiquímico também servem como ponto de partida para a biossíntese de produtos secundários. Dessa forma, esta via é de eminente importância para a síntese de muitos compostos de interesse comercial (HERRMANN e WEAVER, 1999), os quais também dão origem a diversos compostos envolvidos na regulação do crescimento ou na defesa de plantas, destacando-se os taninos condensados, antocianinas, vitamina E, ácido indolacético (IAA), ácido salicílico, flavonas, isoflavonas, fenilpropanóides e cumarinas, fundamentais para o crescimento e desenvolvimento vegetal (VELINI et al., 2012a).

Os níveis de ácido salicílico na população de *C. bonariensis* (P2) suscetível sofreram redução com o aumento das doses de glyphosate que as plantas foram expostas, embora tenha ocorrido um pequeno aumento na dose de 1440 g ha⁻¹, mas mesmo assim, menor do que a testemunha não tratada. As populações 1 e 3 de *C. sumatrensis* apresentaram aumento das concentrações deste composto a partir da aplicação da dose de 360 g ha⁻¹ de glyphosate, com maior acúmulo ocorrendo na dose de 1440 g ha⁻¹ com cerca de 1,5 vezes de aumento para a população 1 e na dose de 2880 g ha⁻¹ com 4,5 vezes de aumento em relação à testemunha (Figura 26). A população 4 (*C. sumatrensis*) apresentou aumento dos níveis de ácido salicílico somente na dose de 2880 g ha⁻¹ sendo 1,2 vezes maior do que a testemunha. No experimento preliminar essa mesma população apresentou acúmulo muito maior deste composto principalmente na dose de 1440 g ha⁻¹.

Sendo a fenilalanina o precursor da biossíntese do ácido salicílico, o aumento nos níveis deste pode estar associado ao aumento dos níveis do aminoácido no tecido (Figura 25). O aumento dos níveis do ácido salicílico nas plantas resistentes ao glyphosate pode tornar essas plantas mais resistentes ao ataque de patógenos, facilitando ainda mais a sua adaptabilidade ecológica, sobrevivência e reprodução em detrimento das plantas suscetíveis presentes nessa população.

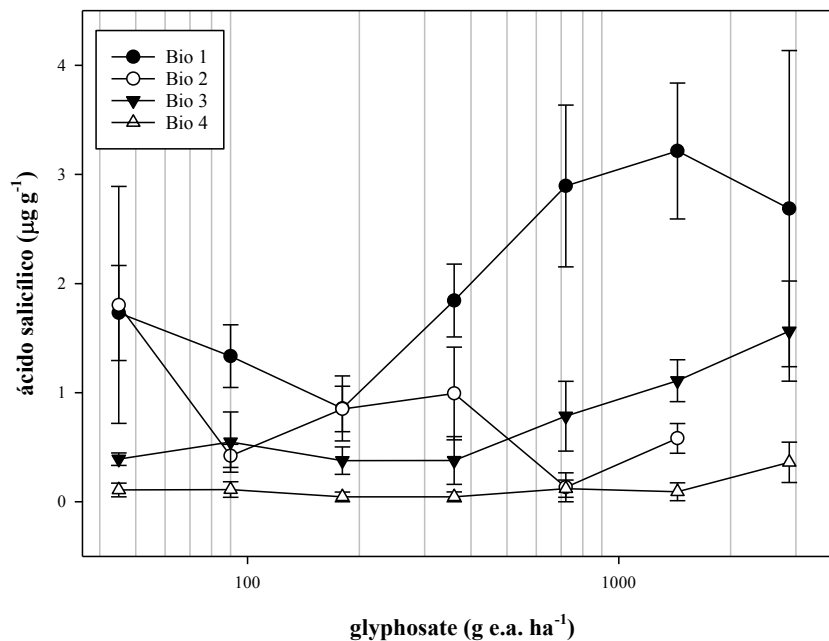


Figura 26. Concentração de ácido salicílico ($\mu\text{g g}^{-1}$) na massa seca (liofilizada) de folhas de *C. sumatrensis* (P1, P3 e P4) e de *C. bonariensis* (P2) tratadas com glyphosate aos 14 DAT.

Os níveis de ácido indolacético (IAA) aumentaram nos tecidos de todas as populações com o aumento das doses de glyphosate aplicadas, com exceção da população 4 (*C. sumatrensis*). A população 2 (*C. bonariensis*) foi a que apresentou maior acúmulo deste composto na dose de 720 g ha^{-1} , sendo quase 14 vezes maior do que a testemunha. Os maiores níveis de IAA nas populações 1 e 3 (*C. sumatrensis*) foram observados nas plantas submetidas à dose de 2880 g ha^{-1} de glyphosate, sendo 3,5 e 7,0 vezes maiores que da testemunha, respectivamente (Figura 26). O IAA tem como precursor para sua biossíntese o aminoácido triptofano, portanto, o aumento dos níveis deste hormônio nas plantas está possivelmente relacionado com o aumento dos níveis do aminoácido (Figura 25).

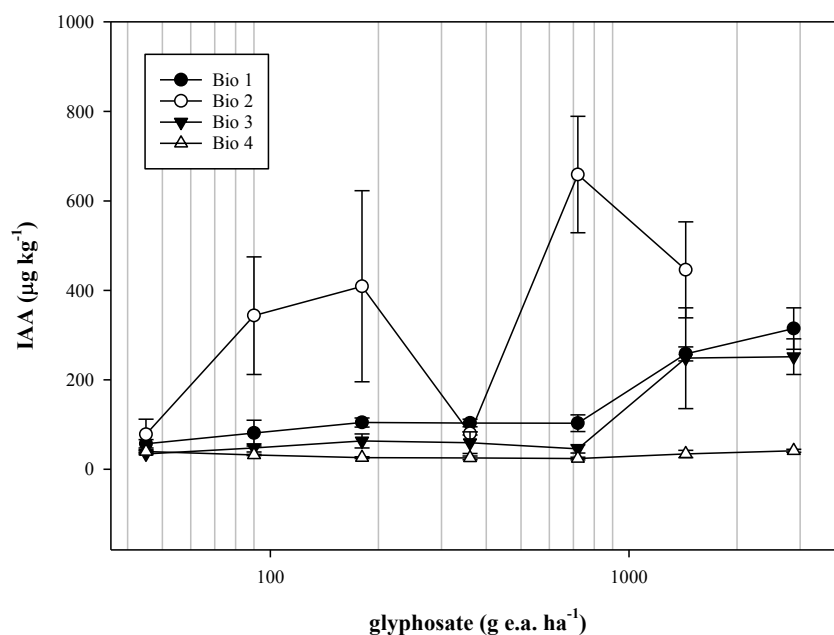


Figura 27. Concentração de ácido indolacético (IAA) ($\mu\text{g kg}^{-1}$) na massa seca (liofilizada) de folhas de *C. sumatrensis* (P1, 3 e 4) e de *C. bonariensis* (P2) tratadas com glyphosate aos 14 DAT.

Ocorreu acúmulo de ácido abscísico (ABA) em todas as populações testadas submetidas à aplicação de glyphosate em relação à testemunha sem aplicação. O maior aumento foi observado para a população 3 (*C. sumatrensis*) quando exposta à dose de 1440 g ha^{-1} de glyphosate, apresentando 8,4 vezes mais ABA do que a testemunha. A população 2 (*C. bonariensis*) acumulou 8 vezes mais ABA do que a testemunha na dose de 720 g ha^{-1} . O aumento da concentração de ABA nas folhas das populações 1 e 4 ocorreram na maior dose de glyphosate (2880 g ha^{-1}) apresentando 1,2 vezes mais ABA do que a testemunha (Figura 28).

Em trabalho realizado com a irrigação de *Pennisetum purpureum* L. com água contendo glyphosate (100 mg L^{-1}), os autores encontraram nas plantas tratadas 1,7 vezes mais IAA na porção basal de folhas jovens do que na testemunha e duas vezes mais ABA (RAJASEKARA et al., 1987). Os autores não encontraram redução dos níveis de IAA nas plantas tratadas assim como esperado, e não ficou claro como as plantas tratadas com glyphosate apresentaram maiores níveis de IAA e ABA quando comparadas com a testemunha. Lee e Dumas (1985) compararam o efeito de 2 mM de glyphosate em diferentes espécies e concluíram que plantas com altos níveis naturais de metabolismo de IAA foram provavelmente menos dependentes do IAA e então menos suscetíveis ao glyphosate.

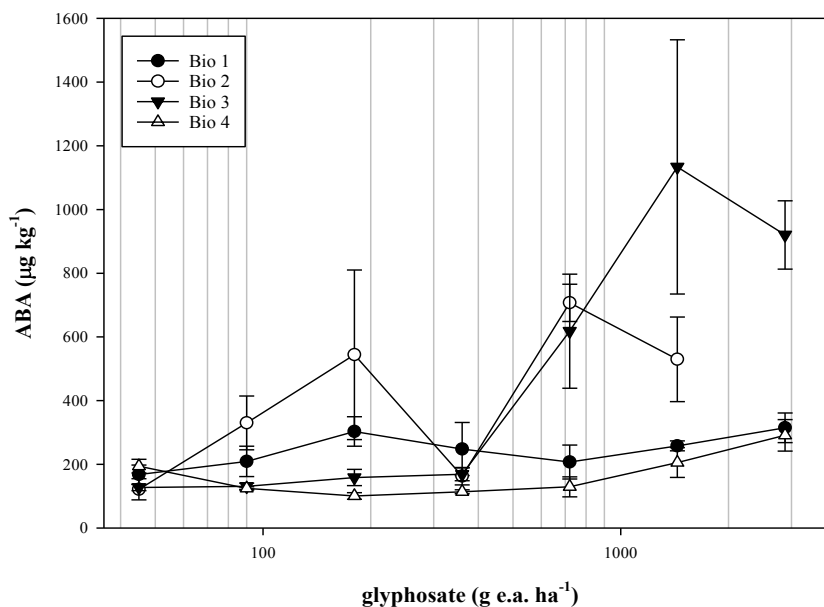


Figura 28. Concentração de ácido abscísico (ABA) ($\mu\text{g kg}^{-1}$) na massa seca (liofilizada) de folhas de *C. sumatrensis* (P1, P3 e P4) e de *C. bonariensis* (P2) tratadas com glyphosate aos 14 DAT.

6.4 Estudo 3: Avaliação do crescimento e produção de sementes

6.4.1. Efeitos do glyphosate no crescimento das plantas

Nas Figuras 29 e 30 estão apresentados os dados de altura e brotações laterais da população 1 da espécie *C. sumatrensis*. Foram realizadas três avaliações aos 42, 70 e 123 DAT, de acordo com o início da fase reprodutiva da planta, com o aparecimento dos primeiros capítulos.

Houve um aumento na altura das plantas que foi observado primeiramente aos 42 DAT e de forma mais pronunciada na avaliação aos 70 DAT, nas plantas que foram expostas às doses de 45 e 90 g ha⁻¹ de glyphosate. A partir da dose de 180 g ha⁻¹ as plantas sofreram redução de porte em relação à testemunha sem aplicação. Aos 123 DAT esse efeito de aumento da altura das plantas não foi mais evidenciado, ou seja, as plantas que não foram submetidas à aplicação de glyphosate atingiram a mesma altura daquelas que foram expostas à dose de 45 g ha⁻¹, com posterior redução das plantas submetidas às doses subsequentes (Figura 29). Observou-se mais uma vez o efeito de

hormesis conforme estudo preliminar, no entanto, o efeito foi transitório e desapareceu na última avaliação já no final do ciclo das plantas.

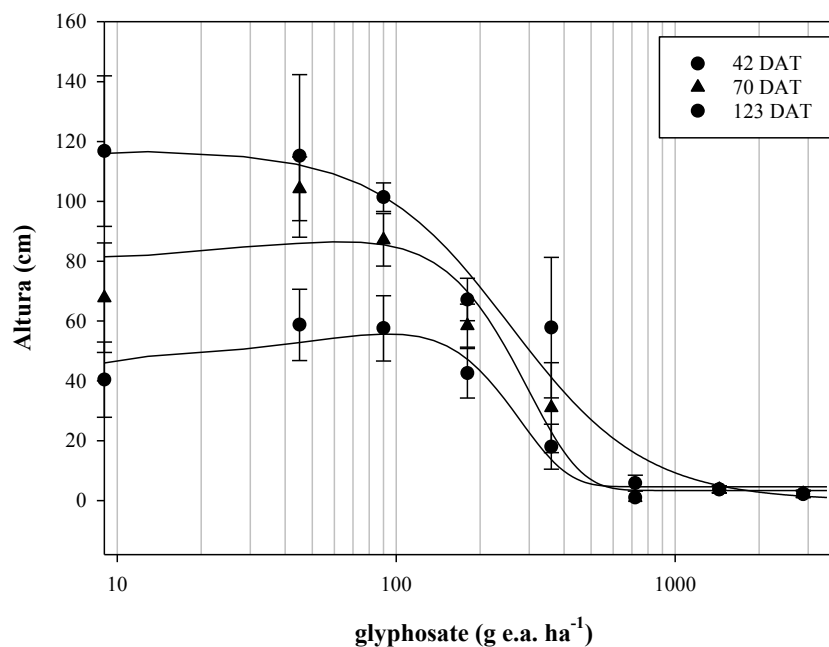


Figura 29. Altura (cm) das plantas de *C. sumatrensis* (P1) tratadas com glyphosate aos 42, 70 e 123 DAT. Equação (42 DAT): $y = 4,65 + 51,01 \cdot \exp(-0,5 \cdot ((x - 93,67) / -143,28)^2)$. $R^2 = 0,9711$. Equação (70 DAT): $y = 3,39 + 83,07 \cdot \exp(-0,5 \cdot ((x - 63,60) / -174,27)^2)$. $R^2 = 0,9386$. Equação (123 DAT) $y = 117,15 / (1 + (x/256)^{1,79})$. $R^2 = 0,9671$.

O número de brotações laterais das plantas de *C. sumatrensis* (P1) está apresentado na Figura 30. As plantas submetidas à dose de 90 até a dose de 720 g ha⁻¹ de glyphosate apresentaram aumento gradativo no número de brotações laterais, com posterior queda a partir da dose de 1440 g ha⁻¹. Este efeito de aumento de produção de brotações laterais está relacionado com o efeito do glyphosate, que quebra a dominância apical da planta (com morte ou não da gema apical), favorecendo a produção dessas brotações. Com o aumento das brotações laterais nas plantas que receberam doses altas de glyphosate, esperava-se que os níveis de IAA, que é o hormônio responsável pela dominância apical, fossem reduzidos, no entanto, os níveis desse hormônio aumentaram com o aumento das doses de glyphosate, provavelmente devido ao aumento do seu precursor, o aminoácido triptofano (Figura 25). Lee (1984) observou aumento das brotações laterais e redução dos níveis de IAA em plantas de soja e feijão submetidas à aplicação de glyphosate.

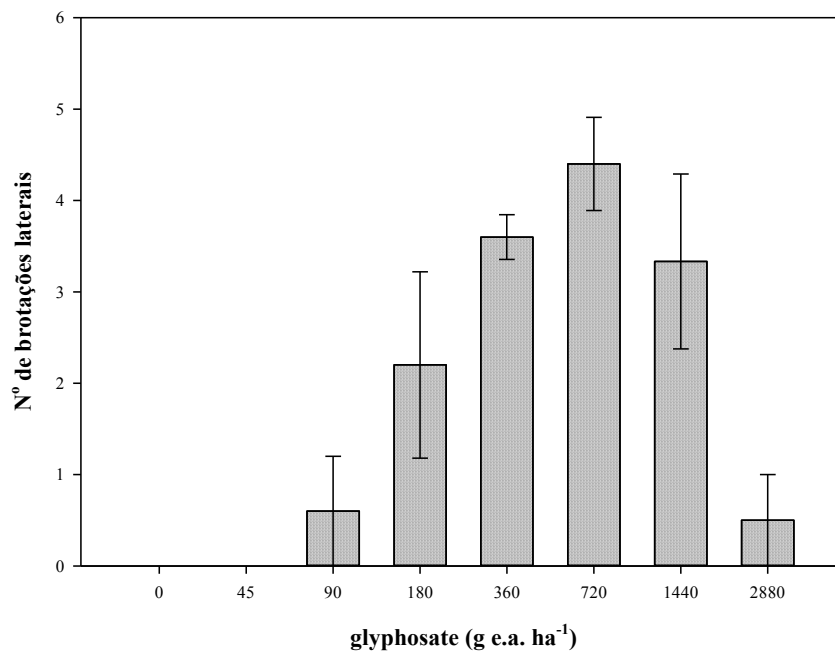


Figura 30. Número de brotações laterais das plantas de *C. sumatrensis*. (P1) tratadas com glyphosate aos 123 DAT. CV = 78,44%; Ftratamento = 8,486**; DMS = 1,66.
** significativo a 1%.

A aplicação de uma dose subletal de glyphosate em plântulas de soja e feijão promoveram o crescimento de brotações laterais mas sem ocasionar a morte da gema apical em trabalho realizado por Lee (1984). A inibição do crescimento pelo glyphosate sem morte do tecido foi observada em cultura de tecidos de tabaco, soja e *Lotus corculatus* L., com crescimento novamente sadio dos calos tratados com o herbicida após serem transferidos para um meio sem o glyphosate (LEE, 1980), evidenciando que a promoção do crescimento das brotações laterais pelo glyphosate em soja e em feijão não foi devido à morte da gema apical (LEE, 1984).

Os dados de altura e número de brotações laterais de *C. bonariensis* (P2) estão apresentados nas Figuras 31 e 32. A dose máxima avaliada para esta população foi de 360 g ha⁻¹ (metade da dose recomendada para controle da espécie), pois a partir desta as plantas não sobreviveram. Para esta população não foi observado aumento de crescimento em altura nas plantas submetidas às doses crescentes de glyphosate em nenhum dos períodos avaliados (65, 91 e 119 DAT), sendo que a dose de 45 g ha⁻¹ de glyphosate já foi suficiente para reduzir 27% a altura das plantas em relação à testemunha aos 119 DAT (Figura 31).

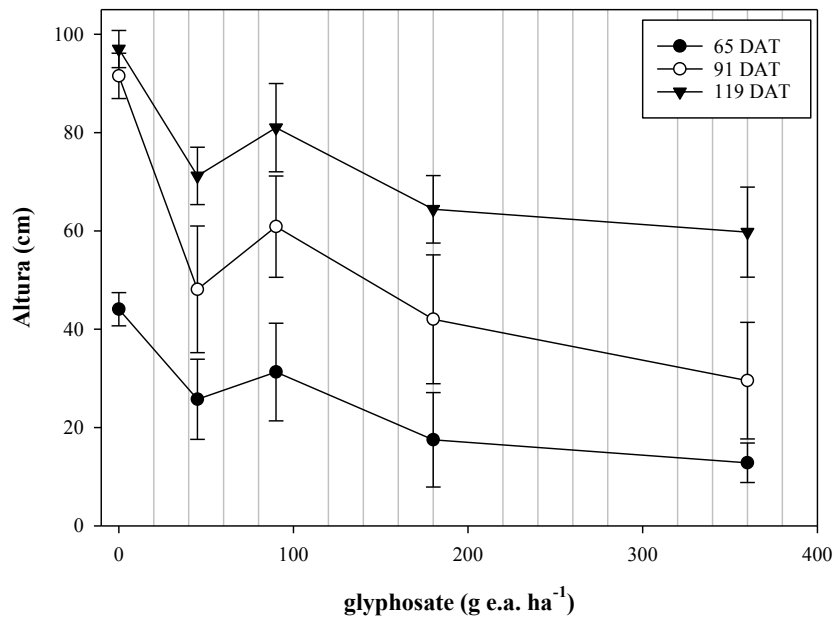


Figura 31. Altura (cm) das plantas de *C. bonariensis* (P2) tratadas com glyphosate aos 65, 91 e 119 DAT. 65 DAT: CV = 65,56%; Ftratamento = 2,952*; DMS = 22,28. 91 DAT: CV = 46,28%; Ftratamento = 6,156**; DMS = 19,24. 119 DAT: CV = 26,59%; Ftratamento = 4,568**; DMS = 25,35. ** significativo a 1%. * significativo a 5%.

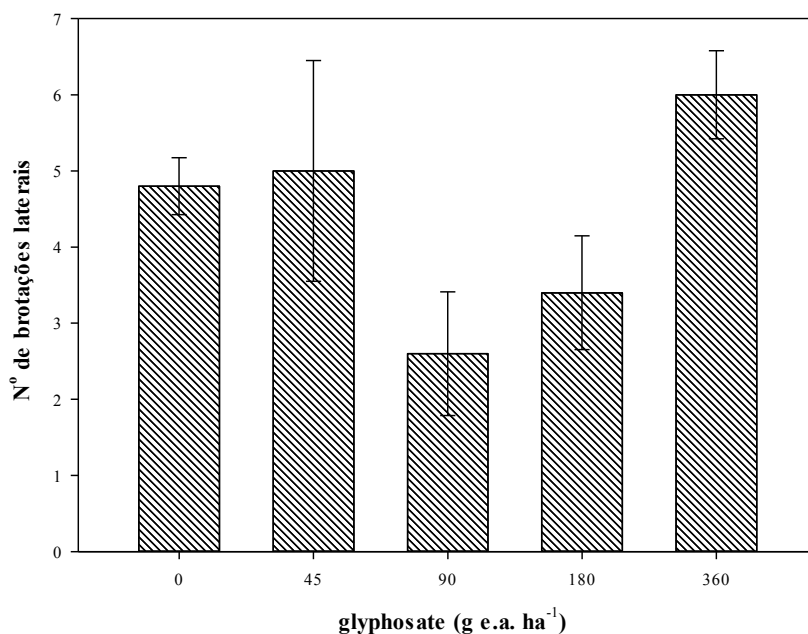


Figura 32. Número de brotações laterais das plantas de *C. bonariensis* (P2) tratadas com glyphosate aos 119 DAT. CV = 54,81%; Ftratamento = 1,110^{ns}; DMS = 2,97. ^{ns} não significativo.

As doses de 90 e 180 g ha⁻¹ de glyphosate reduziram o número de brotações laterais das plantas de *C. bonariensis* (P2), enquanto que as plantas submetidas à dose de 360 g ha⁻¹ tiveram suas brotações laterais levemente estimuladas pelo herbicida, devido provavelmente à quebra da dominância apical (Figura 32).

A população 3 (*C. sumatrensis*) resistente ao glyphosate apresentou também incremento na altura das plantas com a exposição ao glyphosate (Figura 33). A dose de 90 g ha⁻¹ foi a que ocasionou o maior aumento de altura em relação à testemunha nos dois períodos avaliados, aos 113 e 127 DAT. A dose que causou o efeito nesta população foi o dobro da dose que causou o efeito transitório de aumento de altura na população 1 da mesma espécie, também resistente ao glyphosate. As doses de 360 e 720 g ha⁻¹ ocasionaram redução da altura das plantas com relação à testemunha, e as plantas submetidas às doses maiores do que estas não sobreviveram para serem avaliadas.

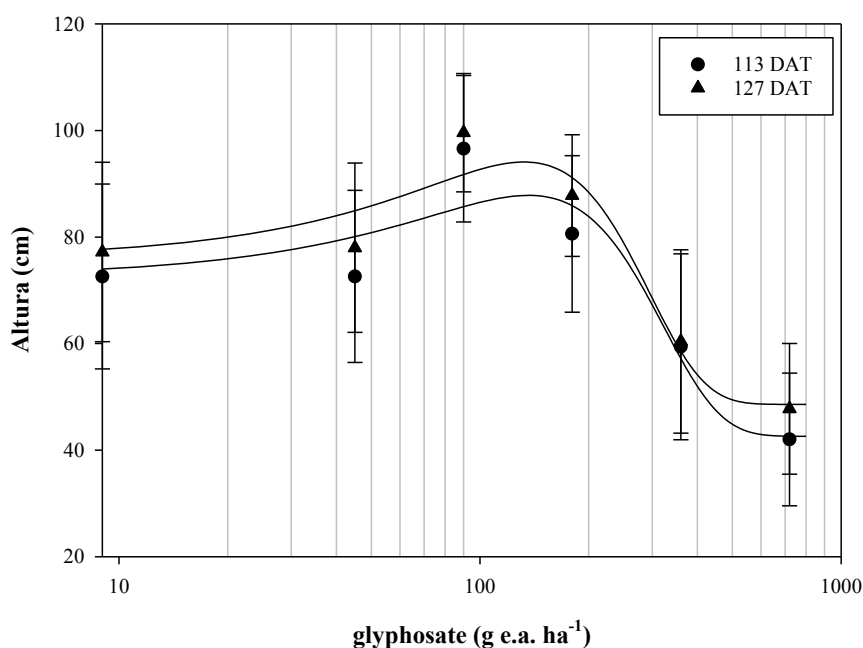


Figura 33. Altura (cm) das plantas de *C. sumatrensis*. (P3) tratadas com glyphosate aos 113 e 127 DAT. Equação (113 DAT): $y = 42,58 + 45,24 \cdot \exp(-0,5 \cdot ((x - 136,17) / -148,73)^2)$. $R^2 = 0,8794$. Equação (127 DAT): $y = 45,57 + 45,51 \cdot \exp(-0,5 \cdot ((x - 132,42) / -130,46)^2)$. $R^2 = 0,9267$.

Não foram observadas diferenças significativas no número de brotações laterais das plantas que receberam aplicações de glyphosate com relação à testemunha (Figura 34). A dose de 360 g ha⁻¹ de glyphosate foi a responsável por causar o

maior efeito de aumento de brotações laterais nas plantas, embora não tenha sido significativamente diferente dos outros tratamentos.

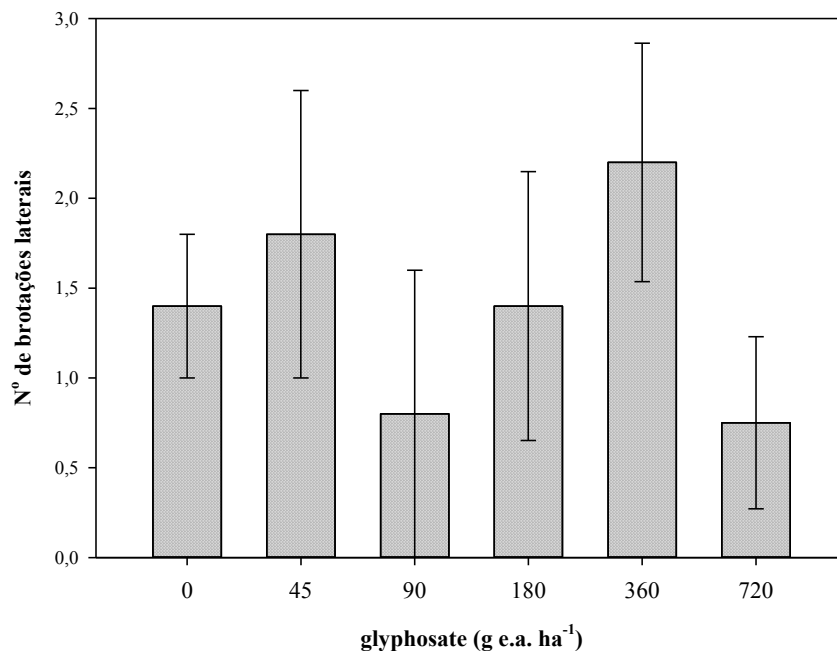


Figura 34. Número de brotações laterais das plantas de *C. sumatrensis*. (P3) tratadas com glyphosate aos 127 DAT. CV = 107,70%; Ftratamento = 0,828^{ns}; DMS = 1,92. ^{ns} não significativo.

Assim como observado no experimento preliminar com a população 4 (*C. sumatrensis*), houve também um pequeno aumento da altura das plantas desta mesma população da geração seguinte principalmente nas doses de 90 e 180 g ha⁻¹ de glyphosate, aos 98 DAT (Figura 35). As doses de 360 a 2880 g ha⁻¹ causaram redução gradativa da altura das plantas, e a partir desta as plantas morreram e não puderam ser mais avaliadas.

O número de brotações laterais da população 4 aumentaram em proporção linear com o aumento das doses de glyphosate (Figura 36). Na dose de 2880 g ha⁻¹ as plantas apresentavam cerca de sete vezes mais brotações laterais do que a testemunha, devido à quebra da dominância apical e consequente favorecimento do aparecimento das mesmas. A promoção do crescimento das gemas laterais seguida da aplicação do glyphosate já foi relatada em *Elytrigia repens* (Caseley, 1972), *Cynodon dactylon* (Fernandez, 1976), sorgo e trigo (Baur et al., 1977) e soja e feijão (Lee, 1984).

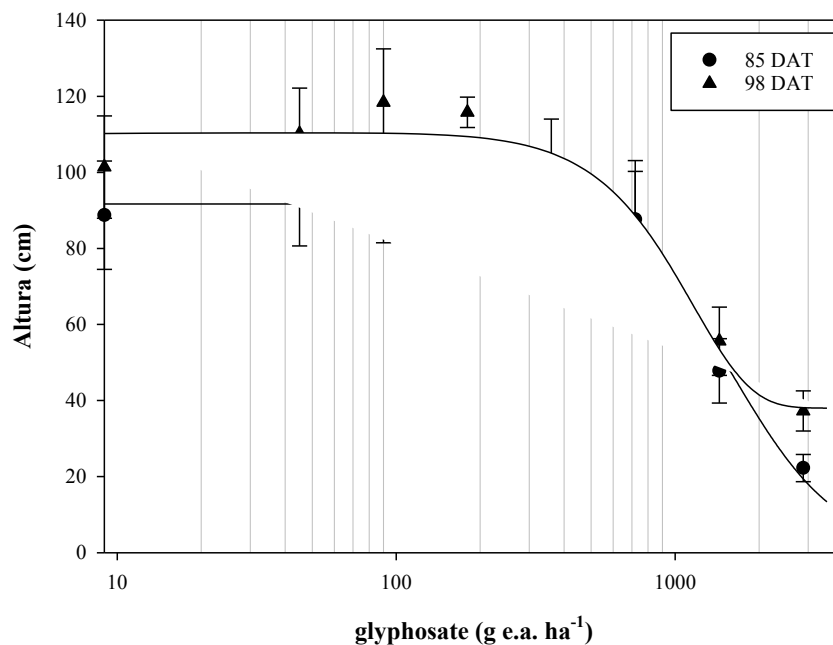


Figura 35. Altura (cm) das plantas de *C. sumatrensis*. (P4) tratadas com glyphosate aos 113 e 127 DAT. Equação (85 DAT): $y = 91,69/(1+(x/1633,38)^{2,31})$. $R^2 = 0,9630$. Equação (98 DAT): $y = 50,23+72,38*\exp(-0,5*((x-50,23)/-791,51)^2)$. $R^2 = 0,9642$.

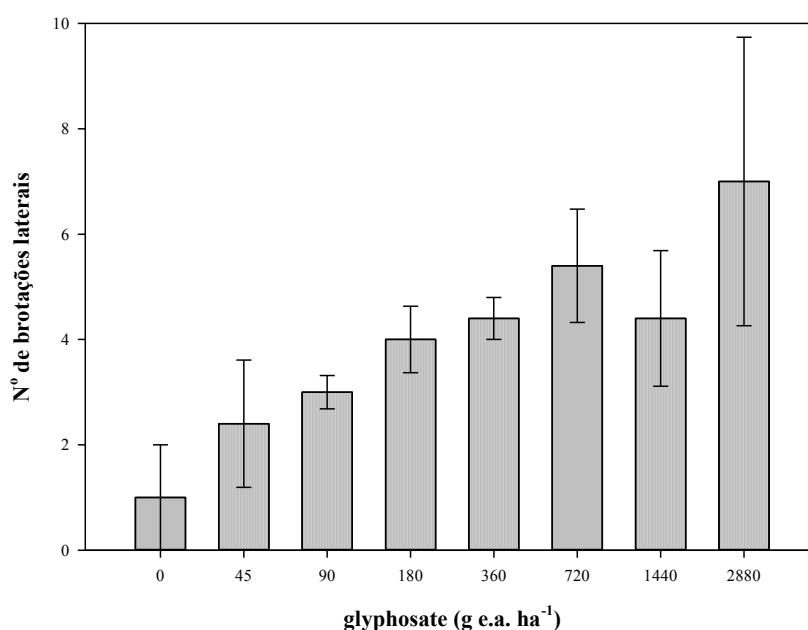


Figura 36. Número de brotações laterais das plantas de *C. sumatrensis*. (P4) tratadas com glyphosate aos 127 DAT. CV = 74,06%; $F_{tratamento} = 1,362^{ns}$; DMS = 3,94. ^{ns} não significativo.

6.4.2. Efeitos do glyphosate no florescimento e produção de sementes

O efeito do glyphosate na produção de sementes de *C. sumatrensis* (P1) estão apresentados nas Figuras 37 e 38. Foram realizadas três avaliações, assim como para os parâmetros de crescimento, altura e número de brotações laterais, nos mesmos períodos. Aos 42 DAT somente as plantas submetidas à dose de 180 e 360 g ha⁻¹ de glyphosate apresentaram a formação capítulos (Figura 38). Este dado evidencia a antecipação do período reprodutivo da *C. sumatrensis* (P1) quando submetida às doses subletais de glyphosate, assim como observado no experimento preliminar para a população 4 da mesma espécie.

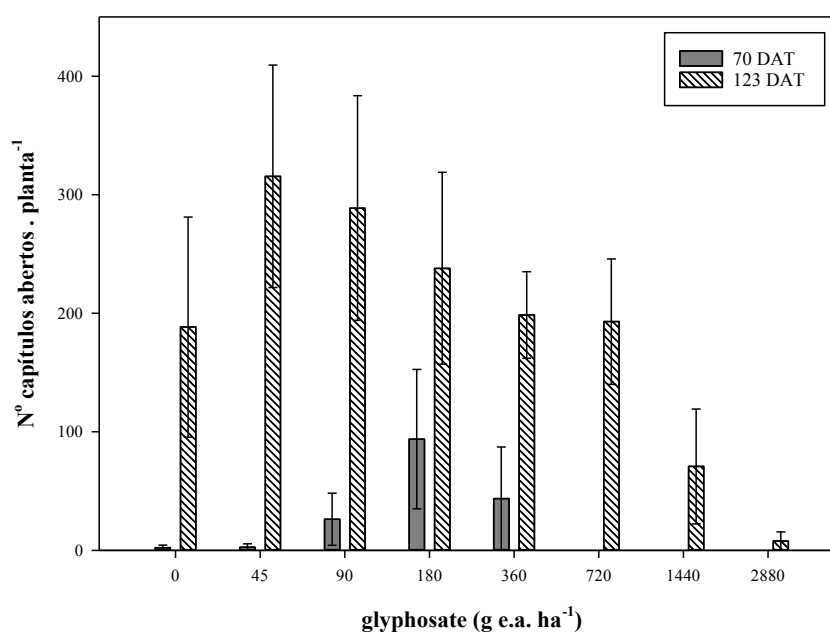


Figura 37. Número de capítulos abertos (já produziram sementes) por planta de *C. sumatrensis*. (P1) tratadas com glyphosate aos 70 e 123 DAT. 70 DAT: CV = 287,44%; Ftratamento = 1,532^{ns}; DMS = 77,94. 123 DAT: CV = 84,69%; Ftratamento = 2,293*; DMS = 202,54. * significativo a 5%. ^{ns} não significativo.

Na avaliação aos 70 DAT, os capítulos dessas plantas e ainda daquelas submetidas à dose de 90 g ha⁻¹ já estavam abertos, ou seja, produzindo sementes. Neste mesmo período foi observado um pico no número total de capítulos, que correspondem aos que já produziram ou estão produzindo sementes (capítulos abertos)

somados aos que ainda não produziram sementes, nas plantas submetidas à dose de 180 g ha⁻¹, sendo quase duas vezes maior do que a testemunha (Figura 37).

Aos 123 DAT as plantas submetidas à aplicação do intervalo de doses de glyphosate que compreende 45 a 720 g ha⁻¹ produziram a mesma quantidade ou foram superiores na produção de sementes em relação à testemunha, principalmente nas doses mais baixas. Somente a partir da dose de 1440 g ha⁻¹ é que o glyphosate reduziu a produção de sementes desta população resistente (Figura 37). O mesmo comportamento foi observado quando se leva em consideração a produção total de capítulos por planta (Figura 38).

O comportamento observado no experimento preliminar para a mesma espécie (P4), foi observado para esta população (P1) com relação à antecipação e aumento do florescimento após a aplicação de glyphosate, e consequentemente a antecipação e aumento da produção e dispersão das sementes.

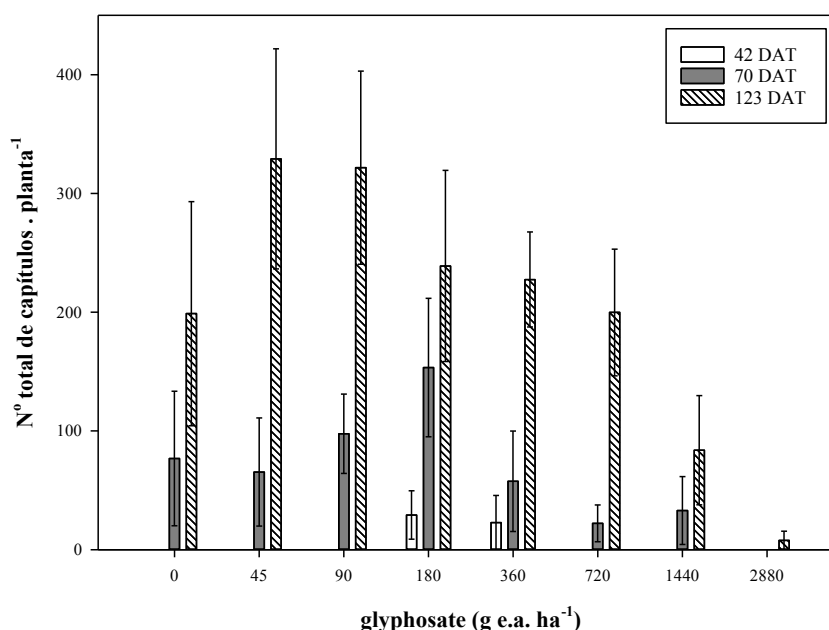


Figura 38. Número total de capítulos (número de capítulos + número de capítulos abertos) por planta de *C. sumatrensis*. (P1) tratadas com glyphosate aos 42, 70 e 123 DAT. 42 DAT: CV = 372,04%; Ftratamento = 1,264^{ns}; DMS = 31,15. 70 DAT: CV = 141,95%; Ftratamento = 1,596^{ns}; DMS = 112,64. 123 DAT: CV = 76,16%; Ftratamento = 2,778*; DMS = 194,93. * significativo a 5%. ^{ns} não significativo.

Londo et al. (2014) testaram os efeitos de subdoses de glyphosate e glufosinate no florescimento e reprodução em *Brassica* spp. e verificaram efeitos somente nas plantas tratadas com glyphosate, resultando em maior número de flores em ambos cultivares sensíveis (*Brassica napus*) nas duas doses testadas (0,05 e 0,10), possivelmente indicando um efeito estimulante de baixos níveis de glyphosate na produção de flores em *B. napus*. O aumento do número de flores não foi observado para as outras variedades testadas neste estudo: *B. napus* cv. RR, *B. rapa* OR, *B. rapa* CA, *B. juncea* e *B. nigra* (LONDO et al., 2014).

Ao contrário do observado para a população 1 (*C. sumatrensis*) resistente ao glyphosate, a população de *C. bonariensis* (P2) suscetível ao herbicida, não apresentou antecipação e nem aumento da produção de capítulos (Figuras 39 e 40). Aos 65 DAT as plantas que não foram submetidas à aplicação de glyphosate apresentaram maior número de capítulos do que às submetidas às doses de 45 e 90 g ha⁻¹, e ainda não apresentavam capítulos abertos, ou seja, com produção de sementes (Figura 39).

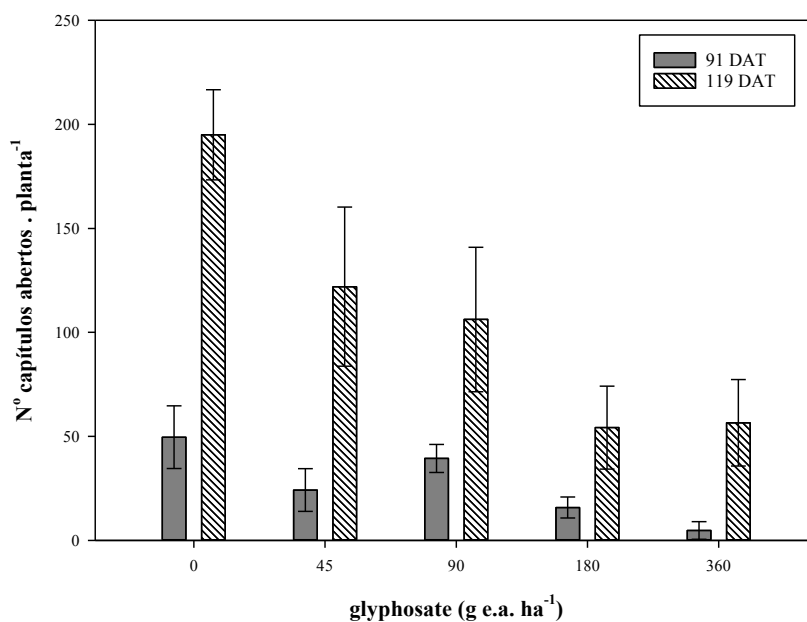


Figura 39. Número de capítulos abertos (já produziram sementes) por planta de *C. bonariensis* (P2) tratadas com glyphosate aos 91 e 119 DAT. 91 DAT: CV = 106,48%; Ftratamento = 5,032**; DMS = 26,97. 119 DAT: CV = 60,47%; Ftratamento = 4,552**; DMS = 83,37. ** significativo a 1%.

O número de capítulos abertos aos 91 DAT foram maiores também na testemunha do que nas plantas expostas ao glyphosate, embora essa diferença não tenha sido significativa para as doses de 45 e 90 g ha⁻¹. A produção de sementes foi evidentemente maior aos 119 DAT, com as plantas sem aplicação de glyphosate apresentando cerca de 40% mais capítulos abertos do que a dose mais baixa de glyphosate (45 g ha⁻¹) (Figura 39).

Essa mesma dose não causou um efeito tão pronunciado no número total de capítulos também aos 119 DAT, evidenciando um atraso na produção dos capítulos nas plantas submetidas à aplicação do glyphosate (45 g ha⁻¹), mas não necessariamente uma redução significativa de produção de capítulos e sementes (Figura 40). A partir de 90 g ha⁻¹, o efeito do herbicida na redução do número total de capítulos foi mais pronunciado, com 40, 65 e 70% de redução para as doses de 90, 180 e 360 g ha⁻¹, respectivamente (Figura 40).

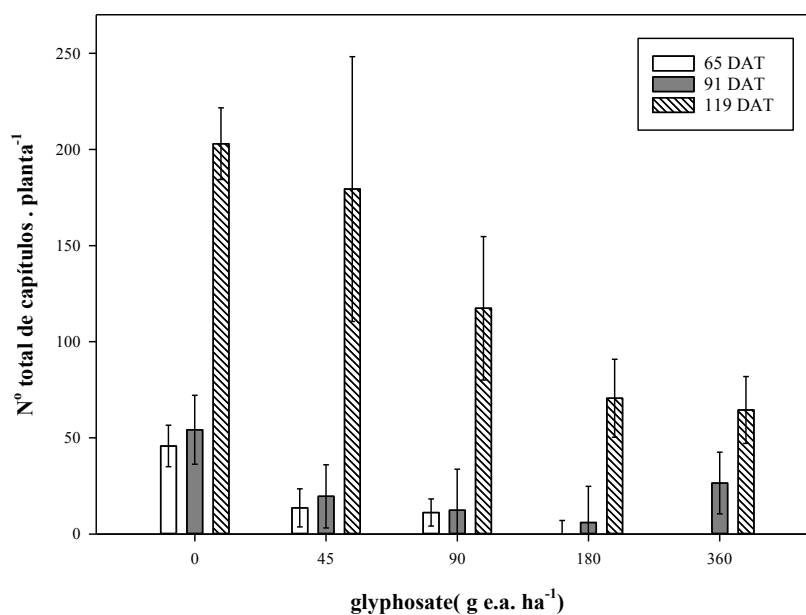


Figura 40. Número total de capítulos (número de capítulos + número de capítulos abertos) por planta de *C. bonariensis* (P2) tratadas com glyphosate aos 65, 91 e 119 DAT. 65 DAT: CV = 114,91%; Ftratamento = 6,701**; DMS = 21,40. 91 DAT: CV = 86,67%; Ftratamento = 3,320*; DMS = 53,09. 119 DAT: CV = 68,60%; Ftratamento = 2,944*; DMS = 112,59. ** significativo a 1%. * significativo a 5%.

Kruger et al. (2010) estudaram a produção de sementes de quatro populações de *C. canadensis* após a exposição ao 2,4-D em pós emergência, sendo que as

plantas que não receberam aplicação não apresentaram diferenças na produção de sementes na ausência da exposição ao 2,4-D, e todas as plantas que foram expostas ao herbicida sofreram reduções drásticas na produção de sementes, com mais de 95% de redução no tratamento com 280 g ha⁻¹ do herbicida.

Aos 113 DAT as plantas da população 3 (*C. sumatrensis*) sem aplicação de glyphosate apresentaram maior número de capítulos abertos com produção de sementes do que as tratadas com o herbicida, embora essa diferença não tenha sido significativa (Figura 41). Já o número total de capítulos neste mesmo período de avaliação foi maior nas plantas submetidas às doses de 90 e 180 g ha⁻¹ de glyphosate (Figura 42).

Esse comportamento alterou-se aos 127 DAT, com maior quantidade de capítulos abertos nas plantas que receberam a dose de 90 g ha⁻¹ de glyphosate quando comparado com a testemunha (Figura 41), assim como maior número total de capítulos por planta (Figura 42), que foi cerca de 2,2 vezes maior do que a testemunha. Embora a antecipação na produção de capítulos abertos não tenha ocorrido nesta população, o aumento da produção de capítulos e consequentemente sementes foi similar ao ocorrido no experimento preliminar (P4) e na população 1 desta mesma espécie (*C. sumatrensis*).

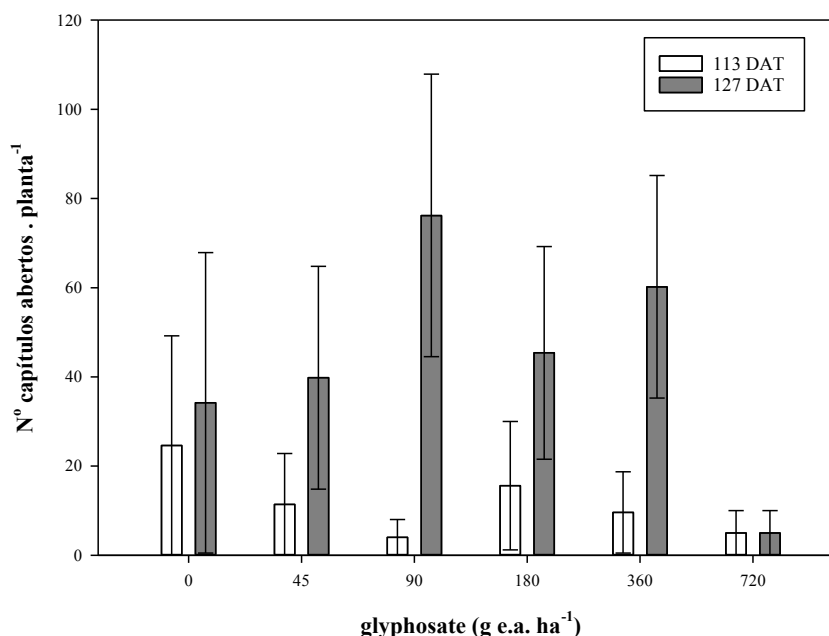


Figura 41. Número de capítulos abertos (já produziram sementes) por planta de *C. sumatrensis*. (P3) tratadas com glyphosate aos 113 e 127 DAT. 113 DAT: CV = 257,32%; Ftratamento = 0,346^{ns}; DMS = 38,73. 127 DAT: CV = 132,88%; Ftratamento = 0,910^{ns}; DMS = 75,10. ^{ns} não significativo.

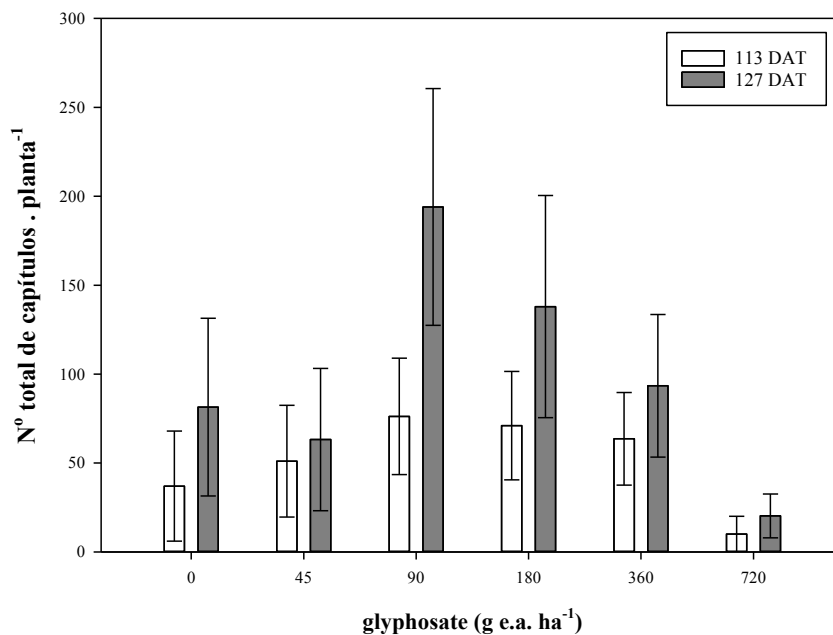


Figura 42. Número total de capítulos (número de capítulos + número de capítulos abertos) por planta de *C. sumatrensis*. (P3) tratadas com glyphosate aos 113 e 127 DAT. 113 DAT: CV = 122,22%; Ftratamento = 0,829^{ns}; DMS = 81,57. 127 DAT: CV = 111,16%; Ftratamento = 1,612^{ns}; DMS = 141,75. ^{ns} não significativo.

A condução do experimento com a população 4 (*C. sumatrensis*) no período do inverno limitou o desenvolvimento acelerado do mesmo, observado no experimento preliminar com as plantas que deram origem às sementes utilizadas. No estudo preliminar aos 28 DAT as plantas já estavam na fase de florescimento, o que não foi observado para este experimento. Até 98 DAT não foi observado o aumento da produção de capítulos abertos nas plantas tratadas com glyphosate, comportamento observado para as demais populações resistentes de *C. sumatrensis* até o momento (Figura 43). O número total de capítulos aumentou sensivelmente aos 98 DAT para as doses de 180 e 1140 g ha⁻¹ de glyphosate quando comparado com a testemunha (Figura 44).

A exposição de *Bassica* spp. a doses subletais de glyphosate ocasionou um atraso no florescimento das plantas, sendo significativamente maiores do que a testemunha não tratada (LONDO et al., 2014). Estes resultados demonstraram o potencial de doses sub letais de glyphosate em alterar o tempo para o florescimento em populações de plantas suscetíveis ao herbicida e essas mudanças na fenologia em plantas daninhas poderiam contribuir para mudanças nos padrões de fluxo de gene entre plantas resistentes e sensíveis (LONDO et al., 2014).

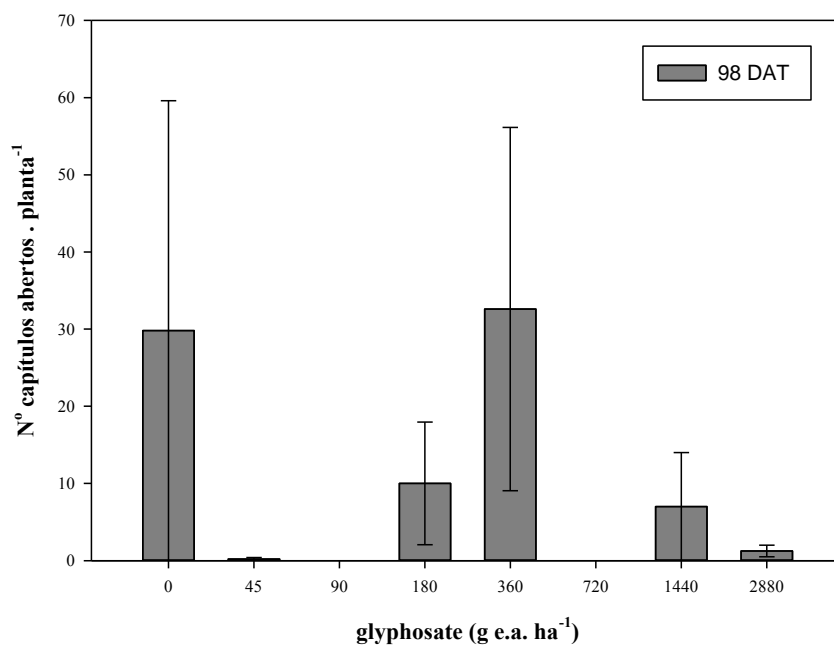


Figura 43. Número de capítulos abertos (já produziram sementes) por planta de *C. sumatrensis*. (P4) tratadas com glyphosate aos 98 DAT CV = 319,95%; Ftratamento = 0,880^{ns}; DMS = 42,66. ^{ns} não significativo.

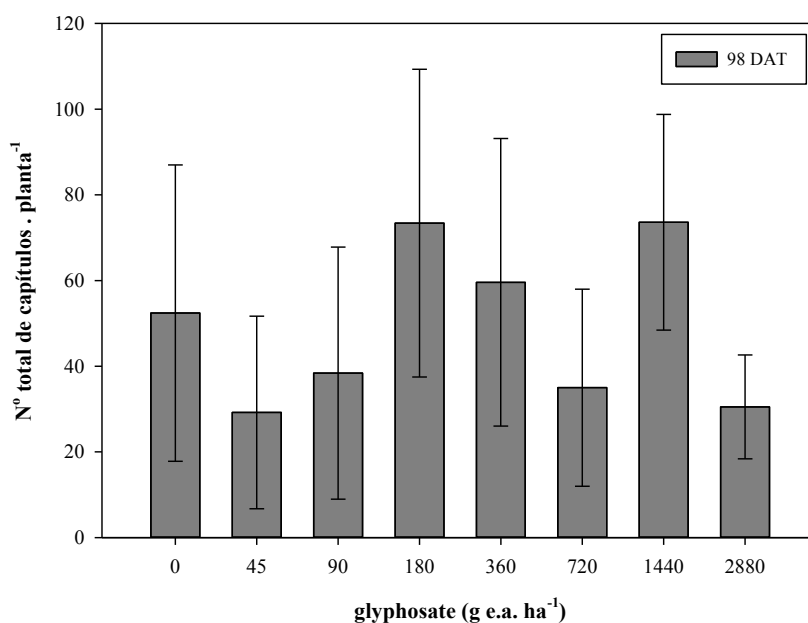


Figura 44. Número total de capítulos (número de capítulos + número de capítulos abertos) por planta de *C. sumatrensis*. (P4) tratadas com glyphosate aos 98 DAT. CV = 133,35%; Ftratamento = 0,540^{ns}; DMS = 85,74. ^{ns} não significativo.

Uma das hipóteses para que o efeito não tenha ocorrido novamente neste experimento é a possível redução do nível de resistência dessa população 4 em baixas temperaturas, pela redução do aprisionamento do herbicida no vacúolo e maior intoxicação. Sendo assim, maiores doses do glyphosate podem ter alcançado o sítio de ação, não permitindo que esta planta expressasse novamente o estímulo na produção de capítulos e sementes.

Na Figura 45 estão apresentados os dados do número médio de capítulos nos tratamentos com aplicação de glyphosate nas doses entre 45 e 360 g e.a. ha⁻¹ em relação ao número médio de capítulos na testemunha nas doses equivalentes. Para doses de até 360 g ha⁻¹ de glyphosate, praticamente todos os dados de número total de capítulos para as populações resistentes (em vermelho) encontram-se acima da linha de equivalência, enquanto que a população suscetível (em verde) está abaixo desta linha, ou seja, as populações resistentes (P1, P3 e P4 - *C. sumatrensis*) apresentaram mais capítulos em média nas plantas tratadas com doses de glyphosate entre 45 a 360 g ha⁻¹ do que na testemunha e a população suscetível (P2 - *C. bonariensis*) apresentou maior número de capítulos nas testemunhas em relação aos tratamentos nesta mesma faixa de dose. Estes dados deixam ainda mais evidente o efeito do glyphosate no aumento do florescimento de populações resistentes de *Conyza sumatrensis*.

As populações 1, 3 e 4 de *C. sumatrensis* podem ter como mecanismo de resistência o sequestro de glyphosate no vacúolo, que é o mecanismo de resistência a glyphosate mais comum em espécies de *Conyza* spp., e consequente redução de eficácia do produto. Com isso, doses bem menores do que as aplicadas conseguem atingir o sítio de ação e bloquear a rota do ácido chiquímico. Portanto, os efeitos horméticos que são observados para diversas espécies após a aplicação de glyphosate em baixas doses foi também observado com relação à altura e número de capítulos para a espécie *C. sumatrensis* resistente ao herbicida mesmo em doses bem mais altas, pelo fato dos reduzidos níveis de glyphosate que provavelmente atingem a enzima alvo (EPSPS). Esse resultado também é evidenciado de maneira indireta pelos menores níveis de acúmulo dos ácidos chiquímico e desidrochiquímico nas populações resistentes (*C. sumatrensis*) em detrimento da população 2 suscetível (*C. bonariensis*).

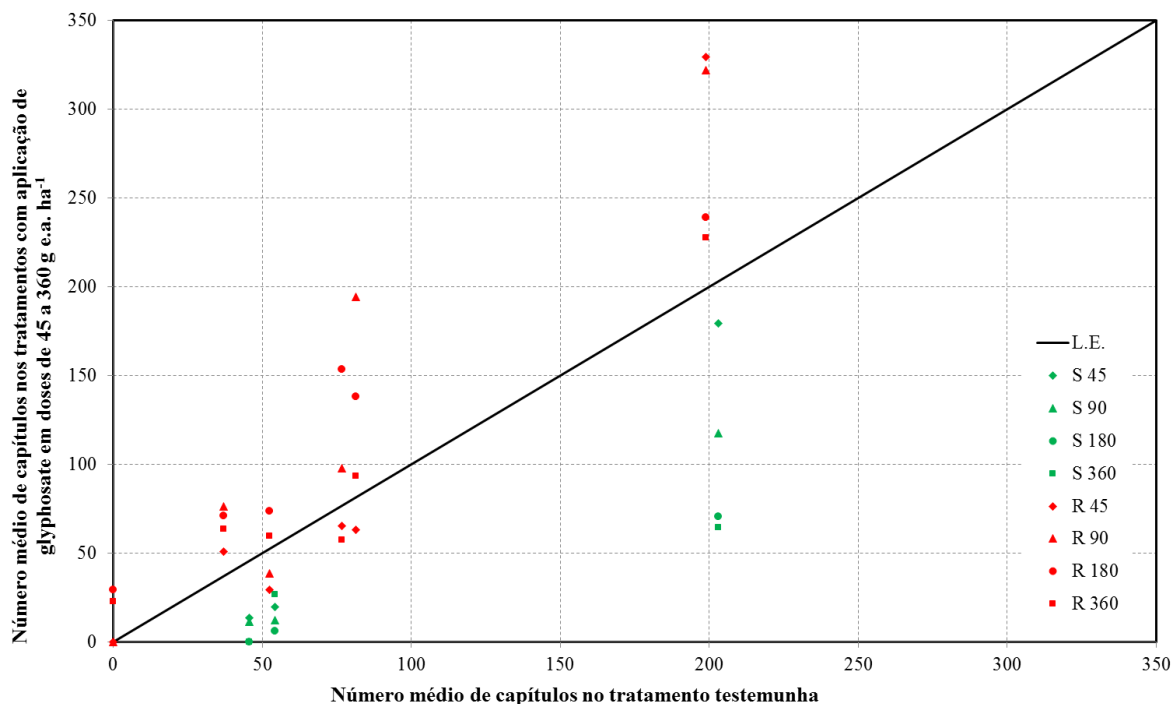


Figura 45. Número médio de capítulos nos tratamentos com a aplicação de glyphosate nas doses de 45 a 360 g e.a. ha⁻¹ e na testemunha sem aplicação nas quatro populações testadas. L. E. = linha de equivalência.

Vários trabalhos relatam diferenças no crescimento, desenvolvimento, fenologia e produção de sementes e competitividade entre biótipos suscetíveis e resistentes de *Conyza* spp. (SHRESTHA et al., 2010; SHRESTHA et al., 2014; DAVIS et al., 2009; ALCORTA et al., 2011; TRAVLOS e CHACHALIS, 2013). Shrestha et al. (2010) observaram um acelerado desenvolvimento fenológico de *C. canadensis* resistente comparada com a suscetível, embora os dois biótipos tenham formado roseta no mesmo período, o biótipo resistente pendoou, formou os botões florais, floresceu e produziu sementes antes do biótipo suscetível. A formação da primeira semente foi observada aproximadamente 3 a 4 semanas antes no biótipo resistente do que no suscetível (SHRESTHA et al., 2010). Fenômeno similar foi reportado por Westhoven et al. (2008) em *Chenopodium album* L. onde os biótipos resistentes iniciaram os primórdios florais de 4 a 6 semanas antes do biótipo suscetível.

Os efeitos do glyphosate no florescimento das plantas foi somente relatado em um único recente trabalho com espécies de *Brassica* spp. (LONDO et al., 2014). Os resultados de antecipação do florescimento e aumento do número de capítulos e consequentemente sementes em espécies de *Conyza* spp., e outras plantas daninhas

importantes após a exposição ao glyphosate não foram ainda relatados. No entanto, é de extrema importância o conhecimento deste mecanismo para o correto manejo desta espécie altamente problemática para a agricultura mundial. É possível que este efeito também ocorra em outras plantas daninhas resistentes ao glyphosate, e também em plantas suscetíveis que recebem subdoses do produto, e novos estudos devem ser realizados com o objetivo de testar e validar esta hipótese. É importante que os mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares sejam estudados na tentativa de elucidar este fenômeno.

A abordagem tradicional nos trabalhos de resistência já publicados é considerar que o aumento da resistência está associado à elevação da dose necessária para controlar os indivíduos de uma determinada população ou à elevação da probabilidade de sobrevivência dos indivíduos desta população em uma determinada dose. A comprovação da antecipação da fase reprodutiva e do aumento na produção e abertura de inflorescências também poderá contribuir para o melhor entendimento da rápida dispersão das populações de *Conyza* spp. resistentes ao glyphosate.

Ou seja, a antecipação do florescimento e aumento da produção de sementes em plantas resistentes ao glyphosate que não sejam controladas eficientemente com doses adequadas ou que sejam expostas à deriva do produto poderão ter uma maior habilidade competitiva do que as plantas suscetíveis em uma população, conseqüentemente, a mudança de composição da flora suscetível pela resistente ocorrerá em uma escala de tempo muito menor, com domínio das plantas resistentes em um curto espaço de tempo.

Neste caso, além de atuar como um agente de seleção das plantas resistentes, por não controlá-las, o glyphosate ainda pode favorecer a produção de sementes e disseminação das mesmas, além de induzir ao aumento dos teores de ácido salicílico, composto relacionado com a tolerância das plantas aos patógenos, conforme os resultados observados. Mais do que nunca passa a ser fundamental a identificação da ocorrência das populações resistentes precocemente para que as aplicações de glyphosate sobre estas plantas não tenham um impacto alto no predomínio desta população, inclusive antecipando a formação de um banco de sementes antes que outras medidas de manejo sejam adotadas.

7 CONCLUSÕES

- As três populações de *Conyza sumatrensis* testadas (P1, P3 e P4) apresentaram resistência ao herbicida glyphosate e a população 2 de *Conyza bonariensis* mostrou-se suscetível ao herbicida;
- Os teores de glyphosate e AMPA nas plantas foram inversamente proporcionais ao nível de resistência das diferentes populações;
- Os teores de dos ácidos chiquímico e desidrochiquímico nas plantas foram inversamente proporcionais ao nível de resistência das diferentes populações;
- Os teores de fenilalanina e tirosina apresentaram comportamento semelhante em todas as populações, com aumento da concentração destes aminoácidos nas folhas expostas às maiores doses de glyphosate nas populações resistentes;
- Os teores de triptofano foram pouco alterados pela presença do glyphosate nas populações resistentes, enquanto que aumentos ocorreram principalmente na população suscetível;
- As populações resistentes (1 e 3) apresentaram aumentos nos níveis de ácido salicílico, enquanto houve queda dos níveis desse composto na população suscetível;
- Os níveis de ácido indolacético e ácido abscísico aumentaram nas plantas submetidas às maiores doses de glyphosate;
- As populações resistentes apresentaram aumento na altura das plantas nas doses de 45, 90 e 180 g ha⁻¹ de glyphosate e maior desenvolvimento de brotações laterais nas doses mais elevadas;
- A antecipação do florescimento e aumento do número total de capítulos e de capítulos abertos ocorreu na população 1 nas plantas que receberam a aplicação de glyphosate nas

doses de 180 e 360 g ha⁻¹; na população 3 nas doses de 90 e 180 g ha⁻¹ e na população 4 (experimento preliminar) nas doses de 90, 180 e 360 g ha⁻¹;

- Não ocorreu antecipação de florescimento e aumento na produção de sementes para a população 2 (suscetível) e população 4 (segundo experimento);

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGAS, F. S. et al. Diagnóstico da existência de *Digitaria insularis* resistente ao herbicida glyphosate no sul do Brasil. **Trabalhos**, XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, p.761-765, Ribeirão Preto, 2010.

ALCORTA, M. et al. Effect of vineyard orientation on growth and phenology of glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible horseweed (*Conyza canadensis*). **Weed Science**, v. 59, n. 1, p. 55-60, 2011.

ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. Massachusetts: Blackwell Publishing Maden, 2007. 642 p.

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, 1980.

AMSELLEM, Z. et al. Developmental variability of photooxidative stress tolerance in paraquat-resistant *Conyza*. **Plant Physiology**, v. 103, n. 4, p.1097-1106, 1993.

ANDERSEN, M. C. An analysis of variability in seed settling velocities of several winddispersed Asteraceae. **American Journal of Botany**, v. 79, n. 10, p. 1087-1091, 1992.

ARREGUI, M. C. et al. Monitoring glyphosate residues in transgenic glyphosate-resistant soybean. **Pest Management Science**, v. 60, n. 2, p. 163-166, 2003.

BAERSON, S. R. et al. Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. **Plant Physiology**, v. 129, n. 3, p. 1265–75, 2002.

BARRY, G. et al. Inhibitors of amino acid biosynthesis: Strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. In: SINGH, B. K.; FLORES, H. E.; SHANNON, J. C. **Biosynthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants**. American Society of Plant Physiologists, p. 139-145, 1992.

BAUR, J. R.; BOVEY, R. W.; VEECH, J. A. Growth responses in sorghum and wheat induced by glyphosate. **Weed Science**, v. 25, n. 3, p. 238-240, 1977.

BECERRIL, J. M.; DUKE, S. O.; LYDON, J. Glyphosate effect on shikimate pathway products in leaves and flowers of velvet leaf. **Phytochemistry**, v. 28, n. 3, p. 695-699, 1989.

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

BHOWMIK, P. C.; BEKECH, M. M. Horseweed (*Conyza canadensis*) seed production, emergence and distribution in no-tillage and conventional-tillage corn (*Zea mays*). **Agronomy**, v. 1, n. 1, p. 67-71, 1993.

BOUDET, A.M., GRAZIANA, A., RANJEVA, R. Recent advances in the regulation of the prearomatic pathway. In: Van Sumere, C.F., Lea, P.J. (Eds.), **Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe**, 25. Clarendon Press, Oxford, p. 135–159, 1985.

BRUNHARO, C. A. C. G. **Resistência da planta daninha capim branco (*Chloris polidactyla*) ao herbicida glyphosate**. 2014. 153p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Fitotecnia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba/SP.

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

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

BURGOS, N.R. et al. Review: confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. **Weed Science**, v. 61, n. 1, p. 4–20, 2013.

CARBONARI, C. A.; MESCHEDE, D. K.; VELINI, E. D. Efeito da aplicação de glyphosate no crescimento inicial de mudas de eucalipto submetidas a dois níveis de adubação fosfatada. **Anais**, I Simpósio Internacional sobre Glyphosate, p. 68-70, Botucatu, 2007a.

CARBONARI, C. A.; MESCHEDE, D. K.; VELINI, E. D. Acúmulo de fósforo em plantas de eucalipto submetidas a aplicação de diferentes doses de glyphosate. **Anais**, I Simpósio Internacional sobre Glyphosate, p. 71-73, Botucatu, 2007b.

CARR, G. D. et al. Chromosome numbers in Compositae. XVIII. **American Journal of Botany**, v. 86, n. 7, p. 1003-1013, 1999.

CARVALHO, L. B.; ALVES, P. L. C. A.; DUKE, S. O. Hormesis with glyphosate depends on coffee growth stage. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 85, n. 2, p.813-821, 2013.

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.

CASELEY, J. C.; COUPLAND, D. Environmental and plant factors affecting glyphosate uptake movement and acidity. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. A. **The herbicide glyphosate**. London, Butterworths, p. 92-123, 1985.

CASELEY, J. C. The effect of environmental factors on the performance of glyphosate against *Agropyron repens*. **Proc Br Weed Control Conf**, v. 11, p. 641-647, 1972.

CENTENO, A. J. **Glyphosate**: uma visão ambiental. In: VELINI, E. D. et al. **Glyphosate**. Fepaf: Botucatu, 493 p., 2009.

CESSNA, A. J. et al. Residues of glyphosate and its metabolite AMPA in field pea, barley, and flax seed following preharvest applications. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 82, n. 2, p. 485-489, 2002.

CESSNA, A. J. et al. Residues of glyphosate and its metabolite AMPA in canola seed following preharvest applications. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 80, n. 2, p. 425-431, 2000.

CESSNA, A.J.; WADDINGTON, J. Dissipation of glyphosate and its metabolite AMPA in established crested whatgrass following spring application. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 75, n. 3, p. 759-762, 1995.

CESSNA, A. J. et al. Residues of glyphosate and its metabolite AMPA in wheat seed and foliage following preharvest applications. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 74, n. 3, p. 653-661, 1994.

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

CHAMBERS, J. C.; MACMAHON, J. A. A day in the life of a seed: movements and fates of seeds and their implications for natural and managed systems. **Annual Review of Ecological Systematics**, v. 25, p. 263-292, 1994.

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

CHRISTOFFOLETI, P. J. et al. Plantas daninhas na cultura da soja: controle químico e resistência a herbicidas. In: CÂMARA, G. M. S. **Soja: tecnologia da produção**. ESALQ: Piracicaba, 2000. P. 179-202.

CIRCUNVIS, B. C. et al. Caracterização genética de amostras de *Conyza* sp. do estado do Paraná. **Planta Daninha**, v. 32, n. 1, p. 173-179, 2014.

CLEGG, M. T. et al. **Genetics and conservation: a reference manual for managing wild animals and plant populations**. Benjamins Cummings Publishing California, 1983.

COLE, D.; PALLET, K.; RODGERS, M. Discovering new modes of action for herbicides and the impact of genomics. **Pesticide Outlook**, v. 11, n. 6, p. 223-229, 2000.

COUSENS, R. D.; MORTIMER, M. **Dynamics of weed populations**. Press Syndicate of the University of Cambridge: Cambridge, 1995.

COX, C. Glyphosate (Roundup) **Journal of Pesticide Reform**, Fall, v. 18, n. 3, 1998.

CRUDEN, R. W. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. **Evolution**, v. 31, n. 1, p. 32-46, 1976.

CRUZ-HIPOLITO, H. et al. Resistance mechanism to acetyl coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides in *Phalaris paradoxa* collected in Mexican wheat fields. **Plant Soil**, v. 355, n. 1-2, p. 121–130, 2012.

CRUZ-HIPOLITO, H. et al. Mechanism of resistance to ACCase-inhibiting herbicides in wild oat (*Avena fatua*) from Latin America. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 7261–7267, 2011.

CULPEPPER, A. S.; GREY, T. L.; VENCILL, W. K. et al. Glyphosate-resistant palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) confirmed in Georgia. **Weed Science**, v. 54, n. 4, p. 620–626, 2006.

DAN, H. A. et al. Histórico da infestação de buva resistente a herbicidas no mundo e no Brasil. In: CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA JR., R. S.; OLIVEIRA NETO, A. M. **Buva: fundamentos e recomendações para manejo**. Omnipax: Curitiba, 104p., 2013.

DAUER, J. T.; MORTENSEN, D. A.; VANGESSEL, J. Temporal and spatial dynamics of long-distance *Conyza canadensis* seed dispersal. **Journal of Applied Ecology**, v. 44, n. 1, p.105-114, 2007.

DAVIS, V. M. et al. Growth and seed production of horseweed (*Conyza canadensis*) populations resistant to glyphosate, ALS-inhibiting, and multiple (glyphosate+ALS-inhibiting) herbicides. **Weed Science**, v. 57, n. 5, p. 494-504, 2009.

DELLACIOPPA, G. et al. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v. 83, n. 18, p. 6973-6877, 1986.

DENIS, M. H.; DELROT, S. Carrier-mediate uptake of glyphosate in brad bean (*Vicia faba*) via a phosphate transporter. **Physiologia Plantarum**, v. 87, n. 4, p. 569-575, 1993.

DEVINE, M. D.; BANDENN, J. D.; MCKERSIE, B. D. Temperature effects on glyphosate absorption, translocation and distribution quack grass (*Agropyron repens*). **Weed Science**. Champaign, v. 31., n. 4, p. 461-464, 1993.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of shikimate metabolites. **Natural Products Reports**, v. 15, n. 1, p. 17-58, 1998.

DICK, R. E.; QUINN, J. P. Glyphosate-degrading environmental samples: occurrence and pathways of degradation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 43, n. 3, p. 545-550, 1995.

DICKSON, J. W. Confirmation of glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. multiflorum) in Arkansas. **Weed Technology**, v. 25, n. 4, p. 674–679, 2011.

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

DINELLI, G. et al. Physiological and molecular bases of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain. **Weed Research**, v. 48, n. 3, p. 257–265, 2008.

DING, L. et al. Functional analysis of the essential bifunctional tobacco enzyme 3-dehydroquinate dehydratase / shikimate dehydrogenase in transgenic tobacco plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 8, p. 2053-2067, 2007.

DUKE, S. O. Biotechnology: Herbicide-Resistant Crops. In: ALFEN, N. K. V. **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**. San Diego: Elsevier, 2014.

DUKE, S.O. Comparing conventional and biotechnology-based pest management. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 11, p. 5793-5798, 2011.

DUKE, S. O. et al. The occurrence of hormesis in plants and algae. **Dose-response**, v. 5, n. 2, p. 150-162, 2006.

DUKE, S. O. et al. Isoflavone, glyphosate, and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 340-344, 2003.

DUKE, S. O. Glyphosate. In: KEARNEY, P. C.; KAUFMAN, D. D. **Herbicides: Chemistry, degradation, and mode of action**. Dekker: NewYork, v. 3, p. 1-70, 1988.

DURGBANSHI, A. et al. Simultaneous Determination of Multiple Phytohormones in Plant Extracts by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Food and Agricultural Chemistry**, v. 53, n. 22, p. 8437-8442, 2005.

DYER, W. E. Resistance to glyphosate. In: POWLES, S.; HOLTUM, J. **Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry**. New York: CRC Lewis Publishers, 1994.

EHRENDORFER, F. Polyploidy and distribution. In: LEWIS W. H. **Polyploidy Biological Relevance**. Plenum Press: New York, 1980

ESCHENBURG, S. et al. How the mutation glycine96 to alanine confers glyphosate insensitivity to 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. **Planta**, v. 216, n. 1, p. 129–35, 2002.

FEINBERG, M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. **A Journal of Chromatography**. v. 1158, n. 1-2, p. 174-183, 2007.

FENG, P. C. C. et al. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. **Weed Science**, v. 52, n. 4, p. 498–505, 2004.

FENG, J. C.; THOMPSON, D. G. Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed 2: persistence in foliage and soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 1118-1125, 1990.

FERNANDEZ, C. H. **Studies on penetration and translocation of glyphosate (N-phosphonomethylglycine) on *Cynodon dactylon* L. Pers.** 1976. Dissertação (Mestrado), University of California, Davis.

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

FUNKE, T. et al. Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation Thr197 → Ile and Pro101 → Ser in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 15, p. 9854–60, 2009.

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

GAINES, T. A. et al. Gene amplification is a mechanism for glyphosate resistance evolution. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 3, p. 1029–34, 2010.

GAZZIERO, D. et al. **Critérios para Relatos Oficiais Estatísticos de Biótipos de Plantas Daninhas Resistentes a Herbicidas**. Sete Lagoas: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas/Campinas: Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas aos Herbicidas no Brasil, 2008.

GE, X. et al. Vacuolar glyphosate sequestration correlates with glyphosate resistance in ryegrass (*Lolium* spp.) from Australia, South America, and Europe: A 31P NMR investigation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 5, p. 1243–1250, 2012.

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

GE, X. et al. Rapid vacuolar sequestration: The horseweed glyphosate resistance mechanism. **Pest Management Science**, v. 66, n. 4, p. 345–348, 2010.

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

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

GERWICK, B. C.; MIRELES, L. C.; EILERS, R. J. Rapid diagnosis of ALS/AHAS-resistant weeds. **Weed Technology**, v. 7, n. 2, p. 519–524, 1993.

GHEREKHLOO, J. et al. Confirmed resistance to aryloxyphenoxypropionate herbicides in *Phalaris minor* populations in Iran. **Weed Biology and Management**, v. 11, n. 1, p. 29–37, 2011.

GIMSING, A. L.; BORGGAARD, O. K.; BANG, M. Influence of soil composition on adsorption of glyphosate and phosphate by contrasting Danish surface soils. **European Journal of Soil Science**, v. 55, n. 1, p. 183–191, 2004.

GITZ, D. C. et al. Effect of a PAL inhibitor on phenolic accumulation and UV-B tolerance in *Spirodela intermedia* (Koch.). **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 398, p. 919-927, 2004.

GODOY, M. C. **Efeitos do glyphosate sobre o crescimento e absorção do fósforo pela soja**. 2007. 43 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura). Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu.

GOLDBLATT, P. Index to plant chromosome numbers: 1982-1983. **Monographs in Systematic Botany of the Missouri Botanical Garden**, v. 13, p. 1-224, 1985.

GOMES, G. L. G. C. **Alterações metabólicas de plantas de milho submetidas à aplicação de glyphosate e fosfito**. 2011. 97p. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas). Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu.

GONCALVES, F. F. **Estudo de métodos empregando HPLC-DAD e LC-MS/MS para a determinação de resíduos de herbicidas em água e solo do cultivo de arroz irrigado**. 2007. 127 p. Tese (Doutorado em Química Analítica). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

GONZALEZ-TORRALVA, F. et al. Two non-target mechanisms are involved in glyphosate resistant (*Conyza canadensis* L. Cronq.) biotypes. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 17, p. 1673–1679, 2012.

GONZÁLEZ-TORRALVA, F. et al. Differential susceptibility to glyphosate among the *Conyza* weed species in Spain. **Journal of Food and Agricultural Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 4361-4366, 2010.

GOUGLER, J. A.; GEIGER, D. R. Uptake and distribution of N-(phosphonomethyl) glycine in sugar beet plants. **Plant Physiology**, v. 68, n. 3, 1981.

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

GREEN, T. D. **The ecology of fleabane (*Conyza* spp.)**. 2010. 173p. Tese (Doutorado em Filosofia). Faculdade de Artes e Ciências, Universidade de New England, Australia.

GUILLET, G. et al. Expression of tryptophan decarboxylase and tyrosine decarboxylase genes in tobacco results in altered biochemical and physiological phenotypes. **Plant Physiology**, v. 122, n. 3, p. 933-943, 2000.

GUI-QI, W. et al. Tribenuron-methyl-resistant shepherd's purse (*Capsella bursa-pastoris* L. Medik) in Hebei province of China. **Agricultural Sciences in China**, v. 10, n. 8, p. 1241–1245, 2011.

HALLAS, L. E.; HAHN, E. M.; KOMDORFER, C. Characterization of microbial traits associated with glyphosate biodegradation in industrial activated sludge. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 377-385, 1988.

HAMOZOZOVÁ, K. et al. Cross-resistance to three frequently used sulfonylurea herbicides in populations of *Apera spica-venti* from the Czech Republic. **Weed Research**, v. 51, n. 2, p. 113–122., 2011.

HAN, H. et al. A novel amino acid substitution Ala-122-Tyr in ALS confers high-level and broad resistance across ALS-inhibiting herbicides. **Pest Management Science**, v. 68, n. 8, p. 1164–1170, 2012.

HAO, J. et al. Reproductive traits associated with invasiveness in *Conyza sumatrensis*. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 47, n. 3, p. 245-254, 2009.

HARPER, J. L.; LOVELL, P. H.; MOORE, K. G. The shapes and sizes of seeds. **Annual Review of Ecological Systematics**, v. 1, n. 1, p. 327-356, 1970.

HARRING, T.; STREIBIG, J. C.; HUSTED, S. Accumulation of shikimic acid: A technique for screening glyphosate efficiency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4406-4412, 1998.

HAUSMAN, N. E. et al. Resistance to HPPD-inhibiting herbicides in a population of waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from Illinois, United States. **Pest Management Science**, v. 67, n. 3, p. 258–261, 2011.

HEALY-FRIED, M. L. et al. Structural basis of glyphosate tolerance resulting from mutations of Pro101 in *E. coli* EPSP synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 45, p. 32949–55, 2007.

HEAP, I. 2014a. **International Survey of Herbicide-Resistant Weeds**. Disponível em: <http://www.weedscience.org> [Acesso em: 01/08/2014].

HEAP, I. Global perspective of herbicide-resistant weeds. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1306-1315, 2014b.

HERNANDEZ, A.; GARCÍA-PLAZAOLA, J. I.; BECERRIL, J. M. Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 2920-2925, 1999.

HERRMANN, K. M.; WEAVER, L. M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, n. 1, p. 473-503, 1999.

HETHERINGTON, P. R. et al. Absorption and efflux of glyphosate by cells suspensions. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 320, p. 527-533, 1998.

HOAGLAND, R. E. Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds: VI. Effects of glyphosine and glyphosate metabolites on phenylalanine ammonia-lyase activity, growth, and protein, chlorophyll, and anthocyanin in soybean (*Glycine max*). **Weed Science**, v. 28, n. 4, p. 393-400, 1980.

HOLM, L. G. **World weeds: natural histories and distribution**. Toronto: Wiley, 1997.

HONEGGER, J. L. et al. Glyphosate transport in plants. In: CORNSHAW, J.; LUCAS, W. J.; GIAQUINTA, R. T. **Phloem transport**, New York: A. R. Liss, 601 p., 1986.

HUAN, Z. et al. Resistance level and metabolism of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* L. Beauv.) populations to quizalofop-P-ethyl in Heilongjiang province, China. **Agricultural Sciences in China**, v. 10, n. 12, p. 1914–1922, 2011.

IBAOUI, H. E. et al. Uptake and release of a non phloem-mobile (iprodione) xenobiotic by broadbean leaf tissues. **Physiologie Vegetale**, v. 24, p.431-442, 1986.

KALOUMENOS, N. S. et al. Corn poppy (*Papaver rhoeas*) cross-resistance to ALS-inhibiting herbicides. **Pest Management Science**, v. 67, n. 5, p. 574–585, 2011.

KARLSSON, L. M.; MILBERG, P. Comparing after-ripening response and germination requirements of *Conyza canadensis* and *C. bonariensis* (Asteraceae) through logistic functions. **Weed Research**, v. 47, n. 5, p. 433-441, 2007.

KASPARY, T. E. et al. Determination of photosynthetic pigments in fleabane biotypes susceptible and resistant to the herbicide glyphosate. **Planta Daninha**, v. 32, n.2, p. 417-426, 2014

KAUNDUN, S. S. et al. Importance of the P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in a goosegrass (*Eleusine indica*) population from the Philippines. **Weed Science**, v. 56, n. 5, p. 637-46, 2008.

KEMPEN, H. M.; GRAF, J. Weed seed production. **Weed Science**, v. 34, n. 1, p. 78-81, 1981.

KIRKWOOD, R. C.; MCKAY, I. Accumulation and elimination of herbicides in select crop and weed species. **Pesticide Science**, v. 42, n. 3, p. 241-249, 1994.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas Infestantes e Nocivas**. São Paulo: BASF, 1999. v.2, 978p.

KRUGER, G. R. et al. Growth and seed production of horseweed (*Conyza Canadensis*) populations after exposure to postemergence 2,4-D. **Weed Science**, v. 58, n. 4, p. 413-419, 2010.

LAMEGO, F.P. et al. Manejo de *Conyza bonariensis* resistente ao glyphosate: coberturas de inverno e herbicidas em pré-semeadura da soja. **Planta Daninha**, v. 31, n. 2, p. 433-442, 2013

LAMEGO, F. P.; VIDAL, R. A. Resistência ao glyphosate em biótipos de *C. bonariensis* e *C. canadensis* no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Planta Daninha**, v. 26, n. 2, p. 467-471, 2008.

LEE L. J.; NGIM, J. A first report of glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica* (L) Gaertn) in Malaysia. **Pest Management Science**, v. 56, n. 4, p. 336-39, 2000.

LEE, T. T.; DUMAS, T. Effect of glyphosate on indole-3-acetic acid metabolism in tolerant and susceptible plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 4, n. 1-4, p. 29-39, 1985.

LEE, T. T. Release of lateral buds from apical dominance by glyphosate in soybean and pea seedlings. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.3, n.1-4, p. 227-235, 1984

LEE, T. T. Characteristics of glyphosate inhibition of growth in soybean and tobacco callus cultures. **Weed Research**, v. 20, n. 6, p. 365-369, 1980.

LINDERS, J. B. H. J. et al. Pesticides: benefaction or Pandora's box? A synopsis of the environmental aspect of 243 pesticides. **Research for Man and Environment**. National Institute of Public Health and Environment. Report 67101014, 1994.

LONDO, J. P. et al. Sub-lethal glyphosate exposure alters flowering phenology and causes transiente male-sterility in *Brassica* spp. **BMC Plant Biology**, v. 14, n.70, 2014.

LORRAINE-COLWILL, D. F. et al. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 74, n. 2, p. 62–72, 2003.

LYDON, J.; DUKE, S. O. Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 36, n. 4, p. 813-818, 1988.

MANTON, I. The geobotanical significance of polyploidy. **Portugal Acta Biologica**. vol. sup, p. 273-352, 1949.

MANEECHOTE, C. et al. Resistance to ACCase-inhibiting herbicides in sprangletop (*Leptochloa chinensis*). **Weed Science**, v. 53, n. 3, p. 290–295, 2005.

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

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

MAUCH-MANI, B.; SLUSARENKO, A. J. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. **Plant Cell**, v. 8, n. 2, p. 203-212, 1996.

MCMULLAN, G. M.; GREEN, J. M. Identification of a tall waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) biotype resistant to HPPD-inhibiting herbicides, atrazine, and thifensulfuron in Iowa. **Weed Technology**, v. 25, n. 3, p. 514–518, 2011.

MCBRIDE, M. B. **Environmental chemistry of soils**. Oxford: Oxford University Press, 1994. 545 p.

MEROTTO, A. et al. Cross-resistance to herbicides of five ALS-inhibiting groups and sequencing of the ALS gene in *Cyperus difformis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1389–1398, 2009.

MIANO, T. M. et al. Infrared and fluorescence spectroscopy of glyphosate-humic acid complexes. **Science of the Total Environment**, v. 123-124, p. 83-92, 1992.

MICHITTE, P. et al. Mechanisms of resistance to glyphosate in a ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. **Weed Science**, v. 55, n. 5, p. 435–40, 2007.

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

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.

MOSS, S. 1999. Detecting herbicide resistance: guidelines for conducting diagnostic tests and interpreting results. **Herbicide Resistance Action Committee (HRAC)**. <http://www.hracglobal.com/Publications/DetectingHerbicideResistance/> [Acesso em: 05/08/2014]

MOUSDALE, D. M.; COGGINS, J. R. Amino acid synthesis. In: KIRKWOOD, R. C. **Target sites for herbicide action**. Plenum Press: New York, p. 29-56, 1991.

MUELLER, T. C. et al. Shikimate accumulates in both glyphosate-sensitive and glyphosate-resistant horseweed (*Conyza Canadensis* L. Cronq.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 680-684, 2003.

NANDULA; V. K. et al. Glyphosate resistance in tall waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from Mississippi is due to both altered target site and non-target site mechanisms. **Weed Science**, v. 61, n. 3, p. 374–383, 2013.

- NANDULA, V. K. et al. Glyphosate tolerance mechanism in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) from Mississippi. **Weed Science**, v. 56, n. 3, p. 344–49, 2008.
- NANDULA, M. N. et al. Glyphosate-resistant and -susceptible soybean (*Glycine max*) and canola (*Brassica napus*) dose response and metabolism relationships with glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3540-3545, 2007.
- NG, C. H. et al. Gene polymorphisms in glyphosate resistant and -susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. **Weed Research**, v. 43, n. 2, p. 108–115, 2003.
- NOL, N. et al. Shikimate leaf disc assay for early detection of glyphosate resistance in *Conyza canadensis* and relative transcript levels of EPSPS and ABC transporter genes. **Weed Research**, v. 52, n. 3, p. 233-241, 2012.
- NOYES, R. D. Biogeographical and evolutionary insights on Erigeron and allies (Asteraceae) from ITS sequence data. **Plant Systematics and Evolution**, v. 220, n. 1-2, p. 93-114, 2000.
- ORCARAY, L. et al. The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. **Pest Management Science**, v. 66, n. 3, p. 262–269, 2010.
- ORNDUFF, R. Reproductive biology in relation to systematics. **Taxonomy**, v. 18, n. 2, p. 121-133, 1969.
- OSSIPOV, V. et al. Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 1, p. 3-16, 2003.
- OWEN, M. J.; GOGGIN, D. E.; POWLES, S. B. Non-target-site-based resistance to ALS-inhibiting herbicides in six *Bromus rigidus* populations from Western Australian cropping fields. **Pest Management Science**, v. 68, n. 7, p. 1077–1082, 2012.
- PALMBLAD, I. G. Competition in experimental populations of weeds with emphasis on the regulations of population size. **Ecology**, v. 49, n. 1, p. 26-34, 1968.
- PENG, Y. et al. Characterization of horseweed (*Conyza canadensis*) transcriptome using GS-FLX 454 pyrosequencing and its application for expressing analysis of candidate non-target herbicide resistance genes. **Pest Management Science**, v. 66, n. 10, p. 1053-1062, 2010.

PETERSEN, I. L. et al. Metabolic effects in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings after root exposure to glyphosate. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 89, n. 3, p. 220–229, 2007.

PLINE, W. A. et al. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and non glyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 506-512, 2002.

PINTO, J. E. B. P. et al. Glyphosate induces 3- deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase in potato (*Solanum tuberosum* L.) cells grown in suspension culture. **Plant Physiology**, v. 87, n. 4, p. 891–893, 1988.

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

POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 317–47, 2010.

POWLES, S. B. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. **Pest Management Science**, v. 64, n. 4, p. 360–365, 2008.

POWLES, S. B. My view: will glyphosate continue to aid world food production? **Weed Science**, v. 51, n. 4, p. 471, 2003.

POWLES, S. B. et al. Evolved resistance to glyphosate in rigidryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. **Weed Science**, v. 46, n. 5, p. 604–607, 1998.

PRATA, F. et al. Influência da matéria orgânica na sorção e dessorção de glifosato em solos com diferentes atributos mineralógicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 4, 2000.

PRATLEY, J. et al. Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. I. Bioevaluation. **Weed Science**, v.47, n. 4, p. 405–411, 1999.

PRESTON, C. et al. A decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the world: mechanisms, genes, fitness and agronomic management. **Weed Science**, v. 57, n. 4, p. 435–41, 2009.

QUEIROGA, C. L. Analisadores de massa: QTRAP. In: **Espectrometria de massas: princípios e aplicações**. Disponível em: <<http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/>> Acesso em: 10 julho de 2014.

RAJASEKARAN, K.; HEIN, M. B.; VASIL, I. K. Endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid and somatic embryogenesis in cultured leaf explants of *Pennisetum purpureum* S chum. **Plant Physiology**, v. 84, n. 1, p. 47-51, 1987.

RAZAQ, Z. A.; VAHIDAY, A. A.; ALI, S. Chromosome numbers in Compositae from Pakistan. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, n. 4, p. 800-808, 1994.

REA, P. A. Plant ATP-binding cassette transportes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, n. 1, p. 347-375, 2007.

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

REAM, J. E. et al. EPSP synthase: binding studies using isothermal titration microcalorimetry and equilibrium dialysis and their implications for ligand recognition and kinetic mechanism. **Biochemistry**, v. 31, n. 24, p. 5528-5534, 1992.

REDDY, K. N.; BELLALOU, N.; ZABLOTOWICZ, R. M. Glyphosate effect on shikimate, nitrate reductase activity, yield, and seed composition in corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3646-3650, 2010.

REDDY, K. N. et al. Aminomethylphosphonic acid accumulation in plant species treated with glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 2125-2130, 2008.

REDDY, K. N.; RIMANDO, A. M.; DUKE, S. O. Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 16, p. 5139-5143, 2004.

REGEHR, D. L.; BAZZAZ, F. A. The population dynamics of *Erigeron Canadensis*, a successional winter annual. **Journal of Ecology**, v. 67, n. 3, p. 923-933, 1979.

REGITANO, J. B. Sorção e dessorção do glyphosate no solo. In: VELINI, E. D. et al. **Glyphosate**. Fepaf: Botucatu, 493 p., 2009.

RIPPERT, P. et al. Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. **Plant Physiology**, v. 134, n. 1, p. 92-100, 2004.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, B. N. **Guia de herbicidas**. Londrina: Edição dos Autores, 2005. 648 p.

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

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

RYALS, J. A. et al. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, v. 8, n.10, p. 1809-1819, 1996.

SALAS, R. A. et al. EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. multiflorum) from Arkansas. **Pest Management Science**, v. 68, n. 19, p. 1223–1230, 2012.

SANTOS, F. M. et al. Estádio de desenvolvimento e superfície foliar reduzem a eficiência de chlorimuron-ethyl e glyphosate em *Conyza sumatrensis*. **Planta Daninha**, v. 32, n. 2, p. 361-375, 2014.

SANTOS, G. et al. *Conyza sumatrensis*: A new weed species resistant to glyphosate in the Americas. **Weed Biology and Management**, v. 14, p. 106–114, 2014.

SANTOS, G. **Resistência múltipla ao glyphosate e ao chlorimuron-ethyl em biótipos de *Conyza sumatrensis***. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Produção de Plantas) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

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

SBCPD – **Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas**. Londrina: SBCPD, 1995. 42 p.

SCHANBENBERGER, O.; KELLS, J. J.; PENNER, D. Statistical tests for hormesis and effective dosage in herbicide dose-response. **Agronomy Journal**, v. 91, n. 4, p. 713-721, 1999.

SCHONBURN, E. et al. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in atomic detail. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, v. 98, n. 4, p. 1376–80, 2001.

SCHULTZ, M. E.; BURSIDE, O. C. Absorption, translocation, and metabolism of 2,4-D and glyphosate in hemp dogbane (*Apocynum cannabinum*). **Weed Science**, v. 28, n. 1, 1980

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

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

SHAH, J. The salicylic acid loop in plant defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 365-371, 2003.

SHANER, D. L.; LINDENMEYER, R. B.; OSTLIE, M. H. What have the mechanisms of resistance to glyphosate taught us? **Pest Management Science**, v.68, n. 1, p. 3–9, 2012.

SHANER, D. L. et al. A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs. **Weed Science**, v. 53, n. 6, p.769–774, 2005.

SHRESTHA, A. et al. Distribution of glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) in Central California and their phenological development. **Journal of Pest Science**, v. 87, p. 201-209, 2014.

SHRESTHA, A. et al. Growth, phenology, and intraspecific competition between glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible horseweeds (*Conyza canadensis*) in the San Joaquin Valley of California. **Weed Science**, v. 58, n. 2, p. 147-153, 2010.

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

SHIELDS, E. J. et al. Horseweed (*Conyza canadensis*) seed collected in the planetary boundary layer. **Weed Science**, v.54, n. 6, p. 1063-1067, 2006.

SINGH, B. K., SHANER, D. L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, v. 12, n. 3, p. 527-530, 1998.

SOLBRIG, O. T. et al. Chromosome numbers in Compositae v. Astereae II. **American Journal of Botany**, v. 51, n. 5, p. 513-519, 1964.

SPRANKLE, P.; MEGGITT, W. F.; PENNER, D. Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil. **Weed Science**, v. 23, n. 3, p. 229-234, 1975.

STAUB, J. M. et al. Bacterial glyphosate resistance conferred by overexpression of an *E. coli* membrane efflux transporter. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 641-647, 2012.

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

SWITZER, C. M. The existence of 2,4-D-resistant strains of wild carrot. **Proc. Northeast. Weed Control Conf.**, v. 11, p. 315-318, 1957.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 719 p.

TAN, S.; EVANS, R.; SINGH, B. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. **Amino Acids**, v. 30, n. 2, p. 195-204, 2006.

TANNER, G. J. et al. Proanthocyanidin biosynthesis in plants: Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 34, p. 31647-31656, 2003.

TEGELEN VAN, L. J. P. et al. Purification and cDNA cloning of isochorismate synthase from elicited cell cultures of *Catharanthus roseus*. **Plant Physiology**, v. 119, n. 2, p. 705-712, 1999.

THEBAUD, C.; ABBOTT, R. J. Characterization of invasive *Conyza* species (Asteraceae) in Europe: quantitative trait and isozyme analysis. **American Journal Botany**, v. 82, n. 3, p. 360-368, 1995.

THEBAUD, C. et al. Assessing why two introduced *Conyza* differ in their ability to invade Mediterranean old fields. **Ecology**, v. 77, n. 3, p. 791-804, 1996.

TOWNSON, J. K.; BUTLER, R. Uptake, translocation and phytotoxicity of imazapyr and glyphosate in *Imperata cylindrica*: effect of herbicide concentration, position of deposit and two methods of direct contact application. **Weed research**, v. 30, n. 4, p. 235-243, 1990.

TRANEL, P. J. et al. Herbicide resistances in *Amaranthus tuberculatus*: A call for new options. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 11, p. 5808–5812, 2011.

TRAVLOS, I. S.; CHACHALIS, D. Relative competitiveness of glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible populations of hairy fleabane, *Conyza bonariensis*. **Journal of Pest Science**, v. 86, n. 2, p. 345-351, 2013.

VARGAS, L. et al. Glyphosate influence on the physiological parameters of *Conyza bonariensis* biotypes. **Planta Daninha**, v. 32, n. 1, p. 151-159, 2014.

VARGAS, L. et al. Buva (*C. bonariensis*) resistente ao glyphosate na região Sul do Brasil. **Planta Daninha**, v. 25, n. 3, p. 573-578, 2007.

VARGAS, L. et al. Alteração das características biológicas dos biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) ocasionada pela resistência ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 23, p. n. 1, 153-160, 2005.

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

VELINI, E. D. et al. **Características e usos do glyphosate**. In: VELINI, E. D. et al. Glyphosate: uso sustentável. Fepaf: Botucatu, 2012a. 213 p.

VELINI, E. D. et al. **Modo de ação do glyphosate**. In: VELINI, E. D. et al. Glyphosate: uso sustentável. Fepaf: Botucatu, 2012b. 213 p.

VELINI, E. D. et al. Growth regulation and other effects of herbicides. **Weed Science**, v. 58, n. 3, p. 351-354, 2010.

VELINI, E. D. et al. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. **Pest Management Science**, v. 64, n. 4, p. 489-496, 2008.

- VENCILL, W. K. et al. Herbicide resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops. **Weed Science**, v. 60, n. spe., p. 2-30, 2012.
- VERRIER, P. J. et al. Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory. **Trends of Plant Science**, v. 13, n. 4, p. 151-159, 2009.
- VIDAL, R. A. et al. Impacto da temperatura, irradiância, e profundidade das Sementes na emergência e germinação de *Conyza bonariensis* e *Conyza Canadensis* resistentes ao glyphosate. **Planta Daninha**, v. 25, n. 2, p. 309-315, 2007.
- WAGNER, R.; KOGAN, M.; PARADA, A. M. Phytotoxic activity of root absorbed glyphosate in corn seedlings (*Zea mays* L.). **Weed Biology and Management**, v. 3, n. 4, p. 228-232, 2003.
- WAKELIN, A. M.; LORRAINE-COLWILL, D. F.; PRESTON, C. Glyphosate resistance in four different populations of *Lolium rigidum* is associated with reduced translocation of glyphosate to meristematic zones. **Weed Research**, v. 44, n. 6, p. 453–459, 2004.
- WANG, C. Y. Effect of glyphosate on aromatic amino acid metabolism in purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). **Weed Technology**, v. 15, n. 4, p. 628-635, 2001.
- WARD, E. R. et al. Coordinate gene activity in response to agents than induce systems acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 3, n. 10, p. 1085-1094, 1991.
- WEAVER, S. E. The biology of Canadian weeds: 115 *Conyza canadensis*. **Canadian Journal Plant Science**, v. 81, n. 4, p. 867-875, 2001.
- Weed Science Society of America (WSSA). Herbicide resistance and herbicide tolerance defined. **Weed Technology**, v. 12, n. 4, p. 789, 1998.
- WESTHOVEN, A. M. et al. Characterization of selected common lambsquarters (*Chenopodium album*) biotypes with tolerance to glyphosate. **Weed Science**, v.56, n. 5, p.685-691, 2008.
- WHITAKER, J.; YORK, A. C.; CULPEPPER, A. S. Glyphosate-resistant Palmer amaranth distribution and control in North Carolina and Georgia. **Proceedings of the Beltwide Cotton Conferences**, Memphis, TN: National Cotton Council of America, 2007, p. 1226-1227.

- WIERSMA, A. **Regional whole plant and molecular response of *Kochia scoparia* to glyphosate**. M.S. Thesis, Colorado State University, 55 pp, 2012.
- WILDERMUTH, M. C. et al. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defense. **Nature**, v. 414, n. 6863, p. 562-571, 2001.
- WISE, A. M. et al. Establishing the geographical distribution and level of acetolactate synthase resistance of Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) accessions in Georgia. **Weed Technology**, v. 23, n. 2, p. 214–220, 2009.
- WU, H. The biology of Australian weeds 49. *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist. **Plant Protection Quarterly**, v. 22, n. 4, p.122-131, 2007.
- WU, H. et al. Germination, persistence and emergence of flaxleaf fleabane (*Conyza bonariensis* [L.] Cronquist). **Weed Biology and Management**, v. 7, n. 3, p. 192-199, 2007.
- XU, X. et al. Confirmation of flixweed (*Descurainia sophia*) resistance to tribenuron-methyl using three different assay methods. **Weed Science**, v. 58, n. 1, p. 56–60, 2010.
- YAMAMUTI, M. S.; BARROSO, A. A. M. Controle químico de biótipos de buva (*Conyza Canadensis* e *Conyza bonariensis*) resistentes ao glyphosate. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 41, n. 3, p.495-500, 2010.
- YU, Q.; CAIRNS, A.; POWLES, S. B. Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance in a *Lolium rigidum* biotype. **Planta**, v. 225, n. 2, p. 499–513, 2007.
- YUAN, J. S. et al. Function genomic analysis of horseweed (*Conyza canadensis*) with special reference to the evolution of non-target-site glyphosate resistance. **Weed Science**, v. 58, n. 2, p. 109-117, 2010.
- ZELAYA, I. A. et al. Evaluation of spectrophotometric and HPLC methods for shikimic acid determination on plants: models in glyphosate-resistant and susceptible crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2202-2212, 2011.
- ZHENG, D. et al. Cross-resistance of horseweed (*Conyza canadensis*) populations with three different ALS mutations. **Pest Management Science**, v. 67, n. 12, p. 1486–1492, 2011.