

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**RESISTÊNCIA DE *Conyza* spp. AO HERBICIDA GLIFOSATO:
DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA, ASPECTOS MOLECULARES,
GENÉTICOS E ANATÔMICOS**

Theodoro Schneider

Passo Fundo

2018

Theodoro Schneider

RESISTÊNCIA DE *Conyza* spp. AO HERBICIDA GLIFOSATO: DISTRIBUIÇÃO
GEOGRÁFICA, ASPECTOS MOLECULARES, GENÉTICOS E ANATÔMICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como
requisito parcial para obtenção de título de Doutor em
Agronomia.

Orientador:

Dr. Mauro Antônio Rizzardi

Comitê de orientação:

Dr. Mario Antonio Bianchi

Dra. Sandra Patussi Brammer

Passo Fundo

2018

CIP – Catalogação na Publicação

S359r Schneider, Theodoro

Resistência de *Conyza* spp. ao herbicida glifosato:
Distribuição geográfica, aspectos anatômicos, genéticos e
moleculares / Theodoro Schneider. – 2018.

110 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Dr. Mauro Antônio Rizzardi.

Comitê de orientação: Dr. Mario Antonio Bianchi, Dra.
Sandra Patussi Brammer.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo
Fundo, 2018.

1. *Conyza*. 2. Plantas - Efeito dos herbicidas. 3. Genética
vegetal. I. Rizzardi, Mauro Antônio, orientador. II. Bianchi,
Mario Antonio, orientador. III. Brammer, Sandra Patussi,
orientador. IV. Título.

CDU: 632.51

ATA DE DEFESA DE TESE



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese

“Resistência de *Conyza* spp. ao herbicida glifosato: Distribuição geográfica, aspectos anatômicos, genéticos e moleculares”.


Elaborada por

Theodoro Schneider


Como requisito parcial para a obtenção do grau de
“Doutor em Agronomia – Área de Produção e Proteção de Plantas”


Aprovada em: 28/03/2018
Pela Comissão Examinadora


Dr. Mauro Antônio Rizzardi
Presidente da Comissão Examinadora
Orientador



Dr. Mario Antonio Bianchi
Coorientador


Dra. Magali Ferrari Grando
Universidade de Passo Fundo


Dr. Anderson Luis Nunes
Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Rio Grande do Sul – Campus Sertão


Dra. Sandra Patussi Brammer
Embrapa Trigo


Dr. Edson Campanholo Bertoluzzi
Coordenador PPGAgro


Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor da Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária, Universidade de Passo Fundo

Aos meus pais, Rudimar e Lucia;
À minha irmã Nícia;
À minha noiva Vanessa.

OFEREÇO E DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da vida e por proporcionar-me força e coragem durante o transcorrer de toda minha carreira acadêmica.

Aos meus pais, Rudimar e Lúcia por terem me concedido a vida e proporcionado todo o carinho, amor, educação e suporte que possibilitaram trilhar este caminho.

A minha irmã Nícia, pelo exemplo de dedicação, caráter, e principalmente pelo amor e amizade, que juntamente com meu sobrinho Solano, sempre proporcionando alegria a toda família.

A minha noiva Vanessa, pelo amor e carinho incondicionais, por se fazer sempre presente durante todas as etapas da minha vida acadêmica.

A família da minha noiva, pela amizade, carinho, apoio e acolhida.

Ao professor Mauro Rizzardi, pela orientação, paciência, incentivo, amizade, e por mostrar-me confiança e segurança, que foram essenciais durante a execução deste trabalho.

Ao professor Mario Bianchi, pelos ensinamentos, amizade, confiança, conselhos, disponibilidade, e por não medir esforços para auxiliar na garantia do bom andamento da pesquisa.

A professora Sandra Brammer, pelo auxílio no cumprimento de etapas essenciais do doutorado, pelos conselhos e disponibilidade de seu laboratório para a realização de parte desta tese.

Ao professor Anderson Nunes, pelos conselhos e contribuições com a sua participação na banca de qualificação.

A professora Magali Grando, pela disponibilidade de seu laboratório para a realização de parte desta tese.

A doutoranda Cássia Ceccon, pelos ensinamentos, paciência e apoio na realização de parte desta tese.

A doutoranda Adriana Favaretto pelo auxílio nas análises anatômicas.

A professora Simone Basso pelo apoio prestado na realização das análises de similaridade genética no software Genes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade de realização do curso e aos professores que contribuíram para minha formação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

A empresa DowAgrosciences pela coleta e cedência das sementes de buva utilizadas neste trabalho.

Aos colegas do laboratório de ecofisiologia de plantas daninhas, que se tornaram grandes amigos, pela amizade, momentos de convívio, incentivo e auxílio na execução das atividades. Em especial aos alunos de Pós-Graduação Ana Paula Rockenbach, Sabrina Peruzzo, Kátia Trevizan.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin
Luther King)

“Os que se encantam com a prática sem a ciência, são como os timoneiros que entram
no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”. (Leonardo da
Vinci)

“O mais competente não discute, domina a sua ciência e cala-se”. (Voltaire)

RESUMO

Schneider, Theodoro. Resistência de *Conyza* spp. ao herbicida glifosato: distribuição geográfica, aspectos moleculares, genéticos e anatômicos. 117 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2018.

O gênero *Conyza* pertencente à família Asteraceae, compreende importantes plantas daninhas conhecidas como “buvas”. Dentre elas, destacam-se *C. canadensis*, *C. bonariensis* e *C. sumatrensis*. Com frequência infestam áreas de cultivo e também áreas não cultivadas. O surgimento de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas está condicionado à mudança genética na população, imposta pela pressão de seleção através da aplicação de herbicidas com mesmo mecanismo de ação. Diante disso, os objetivos dessa pesquisa foram avaliar a distribuição dos biótipos de buva resistentes ao herbicida glifosato nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul; identificar as alternativas químicas para o controle de buva resistente ao glifosato, aplicadas em diferentes estádios de desenvolvimento; realizar a descrição anatômica da folha de biótipos resistentes e suscetível ao glifosato; analisar a similaridade genética em biótipos de *C. sumatrensis*, oriundos de diferentes regiões do Brasil; e investigar o mecanismo de resistência de biótipos de *C. sumatrensis* resistente ao herbicida glifosato através da determinação dos níveis de expressão dos genes *EPSPs* codificador da enzima EPSPs, M11 e M7 genes de proteínas transportadoras ABC. Para isso, foram conduzidos experimentos em casa de vegetação, a campo, e laboratório, utilizando sementes de *Conyza* spp. coletadas em diferentes locais no Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul. Foram avaliados 137 biótipos de *Conyza* spp. quanto a distribuição geográfica da resistência, aplicando-se o herbicida glifosato no estádio de 4 a 6 folhas, e avaliado a resposta ao herbicida determinando a resistência. A campo foram conduzidos dois experimentos nas safras 2016/17 e 2017/18, onde foram aplicados vários herbicidas, pertencentes a diferentes mecanismos de ação visando identificar diferentes alternativas de controle de *Conyza* spp. Para a realização da análise anatômica, foram coletadas folhas de duas populações de *C. sumatrensis* resistente ao glifosato e outra suscetível. Foram realizadas a determinação da espessura da epiderme na face adaxial das folhas dos biótipos e o diâmetro dos feixes vasculares principais. Através de marcadores moleculares microssatélites foi analisada a similaridade genética entre biótipos de *C. sumatrensis* de diferentes regiões geográficas, sendo utilizados 19 marcadores moleculares, e comparados por meio de gel de agarose. Para a investigação do mecanismo de resistência em biótipo de *C. sumatrensis* resistente ao glifosato, foi comparado o nível de expressão dos genes *EPSPs*, M11 e M7 nos biótipos resistente e suscetível. Para isso extraiu-se o RNA dos biótipos e comparou-se a expressão dos genes por meio de PCR em tempo real (RT-qPCR). Obteve-se como resultados, que 78% dos biótipos de *Conyza* spp. testados apresentaram resistência ao herbicida

glifosato. Plantas de buva com até 5 cm são controladas com os herbicidas glifosato+saflufenacil, paraquate, diquat e glufosinato de amônio, já plantas entre 6 e 15 cm são controladas com os mesmos tratamentos, exceto paraquate. Não foram encontradas diferenças anatômicas nos biótipos avaliados neste estudo. A análise de similaridade genética evidenciou diversidade dos biótipos, formando dois grupos, um formado por um biótipo suscetível e outro por biótipos resistentes ao glifosato. Os genes M7 e M11 apresentaram maior expressão relativa no biótipo resistente, associando o mecanismo de resistência ao sequestro do herbicida no vacúolo.

Palavras-chave: 1. Extensão da resistência. 2. Controle alternativo. 3. Mecanismo de resistência. 4. Similaridade genética. 5. Expressão gênica.

ABSTRACT

Schneider, Theodoro. Resistence of *Conyza* spp. to glyphosate herbicide: geographic distribution, molecular, genetic ang anatomical aspects. 117 f. Thesis (Doctorate in Agronomy) – University of Passo Fundo, Passo Fundo, 2018.

The genus *Conyza* belonging to the family Asteraceae, comprises important weeds known as "buvas". Among them, stand out *C. canadensis*, *C. bonariensis* and *C. sumatrensis*. They often infest growing areas as well as uncultivated areas. The emergence of herbicide resistant weed biotypes is conditioned by the genetic change in the population, imposed by selection pressure through the application of herbicides with the same mechanism of action. Therefore, the objectives of this research were to evaluate the distribution of buff biotypes resistant to glyphosate herbicide in the States of Rio Grande do Sul, Paraná and Mato Grosso do Sul; to identify the chemical alternatives for control of glyphosate resistant buff, applied at different stages of development; to perform the anatomical description of the biotype resistant and susceptible to glyphosate leaf; to analyze the genetic similarity in *C. sumatrensis* biotypes from different regions of Brazil; and to investigate the resistance mechanism of biotypes of *C. sumatrensis* resistant to herbicide glyphosate by determining the expression levels of *EPSPs* genes encoding the *EPSPs* enzyme, *M11* and *M7* genes of ABC carrier proteins. For this, experiments were conducted in greenhouse, field, and laboratory, using seeds of *Conyza* spp. collected in different locations in Rio Grande do Sul, Paraná and Mato Grosso do Sul. We evaluated 137 biotypes of *Conyza* spp. as well as the geographic distribution of the resistance, applying the glyphosate herbicide in the 4 to 6 leaf stage, and evaluating the herbicide response determining the resistance. In the field two experiments were conducted in the 2016/17 and 2017/18 crops, where several herbicides belonging to different mechanisms of action were used to identify different control alternatives of *Conyza* spp. For the anatomical analysis, leaves of two populations of *C. sumatrensis* resistant to glyphosate and another susceptible were collected. The determination of the thickness of the epidermis on the adaxial face of the leaves of the biotypes and the diameter of the main vascular bundles were performed. Through microsatellite molecular markers the genetic similarity between *C. sumatrensis* biotypes from different geographical regions was analyzed, using 19 molecular markers, and compared by means of agarose gel. For the investigation of resistance mechanism in glyphosate resistant *C. sumatrensis* biotype, the level of expression of the *EPSPs*, *M11* and *M7* genes in resistant and susceptible biotypes was compared. RNA was extracted from the biotypes and the expression of the genes was compared by means of real-time PCR (RT-qPCR). It was obtained as results, that 78% of the biotypes of *Conyza* spp. tested showed resistance to glyphosate herbicide. Plants of buff up to 5 cm are controlled with the herbicides glyphosate + saflufenacil, paraquate, diquat and

glufosinate of ammonium, already plants between 6 and 15 cm are controlled with the same treatments, except Paraquate. No anatomical differences were found in the biotypes evaluated in this study. The analysis of genetic similarity evidenced a diversity of biotypes, forming two groups, one formed by a susceptible biotype and the other by glyphosate - resistant biotypes. The *M7* and *M11* genes presented higher relative expression in the resistant biotype, associating the mechanism of resistance to the sequestration of the herbicide in the vacuole.

Key words: 1. Resistance extention. 2. Alternative control. 3. Mechanism of resistance. 4. Genetic similarity. 5. Genic expression.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
3	CAPÍTULO I	29
3.1	Resumo	27
3.2	Abstract	30
3.3	Introdução	330
3.4	Material e Métodos	33
3.5	Resultados e Discussão	35
3.5	Conclusões	43
4	CAPÍTULO II	44
4.1	Resumo	44
4.2	Abstract	45
4.3	Introdução	45
4.4	Material e Métodos	47
4.5	Resultados e Discussão	49
4.6	Conclusões	60
5	CAPÍTULO III	61
5.1	Resumo	61
5.2	Abstract	62
5.3	Introdução	64
5.4	Material e Métodos	664
5.5	Resultados e Discussão	66
5.6	Conclusões	72
6	CAPÍTULO IV	73
6.1	Resumo	73
6.2	Abstract	74
6.3	Introdução	74
6.4	Material e Métodos	77
6.4.1	Material Vegetal	77
6.4.2	Extração do DNA	79
6.4.3	Quantificação dos DNAs extraídos de <i>C. sumatrensis</i>	80

6.4.4 Marcadores moleculares e variabilidade genética	81
6.5 Resultados e Discussão	83
6.6 Conclusões	90
7 CAPÍTULO V	91
7.1 Resumo	91
7.2 Abstract	92
7.3 Introdução	92
7.4 Material e Métodos	95
7.4.1 Material Vegetal	95
7.4.2 Aplicação dos herbicidas e coleta do material vegetal	96
7.4.3 Extração do RNA e síntese do cDNA	96
7.4.4 Análise em RT-qPCR	97
7.4.5 Análise da expressão gênica	98
7.5 Resultados e Discussão	98
7.5.1 Análise da expressão do gene <i>EPSPs</i>	98
7.5.2 Análise da expressão dos genes <i>M7</i> e <i>M11</i>	100
7.6 Conclusões	105
8 CONCLUSÃO GERAL	106
9 REFERÊNCIAS	107

1 INTRODUÇÃO

A utilização de herbicidas como único método de manejo das plantas daninhas, repetidamente e por muitos anos, na mesma área, resultou na evolução de plantas daninhas resistentes aos mesmos. Em áreas cultivadas com culturas geneticamente modificadas, como é o caso da soja resistente ao herbicida glifosato, a seleção de biótipos de plantas daninhas resistentes foi acentuada, em função da grande utilização deste produto.

Inúmeras culturas agrícolas, tais como soja, milho, trigo, algodão e forrageiras, são diretamente afetadas pela presença de plantas daninhas do gênero *Conyza*, que devido a elevada capacidade competitiva e prolificidade, tornou-se importante planta daninha. Plantas daninhas deste gênero apresentam elevada variabilidade genética, o que facilita sua introdução tanto em cultivos de inverno como de verão. Ainda, a pressão de seleção exercida pela aplicação do herbicida glifosato, selecionou-se populações resistentes de *C. canadensis*, *C. bonariensis* e *C. sumatrensis*, tornando difícil o manejo dessas plantas daninhas nesses cultivos, principalmente devido a baixa disponibilidade de moléculas herbicidas de outros mecanismos de ação com seletividade a essas culturas.

As plantas daninhas são o principal fator biótico que afeta a produção agrícola, sendo que 13 plantas m² são responsáveis por causar 25% de redução de rendimento em soja (TREZZI et al., 2013). O controle de plantas daninhas com aplicação de herbicidas é considerado o método mais eficaz e eficiente em termos de custo e praticidade. A introdução de culturas geneticamente modificadas resultou em aumento significativo do uso de um mesmo herbicida e, como consequência, maior evolução de populações de plantas daninhas resistentes (POWLES; YU, 2010).

A resistência das plantas daninhas aos herbicidas é definida pela FAO como a ocorrência natural de biótipo com habilidade de sobreviver à aplicação de composto químico para o qual a população original era suscetível (LEBARON; GRESSEL, 1982). Enquanto, Christoffoleti e Nicolai (2016), definem a resistência como a capacidade

natural e herdável de determinados biótipos, dentro de uma população, de sobreviver e se reproduzir após a exposição a dose herbicida que seria letal a indivíduos normais (suscetíveis) da mesma espécie.

Atualmente no Brasil, o comitê de ação à resistência de plantas daninhas a herbicidas (CBRPH) e a associação brasileira de ação à resistência de plantas aos herbicidas no Brasil (HRAC-BR), descrevem em cinco itens os critérios para relatos oficiais estatísticos de biótipos de plantas daninhas resistentes a herbicidas: Definição de resistência de plantas daninhas (enquadramento nas definições); Confirmação por meio de resultados obtidos por protocolos com base científica; Caracterização da herdabilidade da resistência da planta daninha ao herbicida; Demonstração do impacto prático no campo da resistência da planta daninha ao herbicida; Identificação botânica da espécie da planta daninha em análise, e não como resultado de uma seleção deliberada/artificial (CHRISTOFFOLETI; NICOLAI, 2014).

A resistência de buva ao glifosato é um problema de caráter mundial, desta forma, a caracterização da resistência é fundamental, pois a partir da identificação dos fatores envolvidos na ocorrência do processo de evolução da resistência é possível prever e identificar mecanismos e alternativas de minimizar o processo de evolução e reverter esta situação tornando o cultivo agrícola sustentável. A ocorrência da resistência de buva torna o uso desta molécula inviável para o controle desta espécie daninha. Desta forma, a identificação dos processos envolvidos é possível lançar mão de novas alternativas de controle. A partir de identificados estes fatores, torna-se viável a pesquisa de diferentes ferramentas que possam auxiliar nas medidas de manejo e na redução da população e disseminação da resistência.

1.1.1.1.1. Hipotetiza-se que a grande maioria da população de *Conyza* spp. apresenta resistência ao glifosato; em estádios iniciais de desenvolvimento as plantas de *Conyza* spp. são mais suscetíveis aos herbicidas, não há diferenças anatômicas entre biótipos de *Conyza sumatrensis* resistente e suscetível ao glifosato; há ampla variabilidade genética entre populações de *Conyza sumatrensis* resistente ao glifosato; e o mecanismo de

resistência de *Conyza sumatrensis* ao glifosato esta associado a superexpressão do gene EPSPs e genes de proteínas transportadoras ABC.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O surgimento de resistência a um herbicida em populações de plantas deve-se à seleção de biótipos resistentes pré-existentes, que resultam da pressão de seleção exercidas por repetidas aplicações de um mesmo herbicida com mesmo mecanismo de ação, encontrando condições para multiplicação (BETTS et al., 1992). Em geral, biótipos ou genótipos de uma espécie que melhor se adaptam a uma determinada prática são selecionados e multiplicam-se rapidamente (HOLT; LEBARON, 1990).

O primeiro caso de resistência de plantas daninhas a herbicidas registrado no mundo ocorreu nos EUA com as espécies *Commelina difusa* e no Canadá com *Daucus carota*, em 1957, em ambos os casos, a resistência apresentada foi ao mecanismo de ação das auxinas sintéticas (HEAP, 2018). Posteriormente, no ano de 1970, nos EUA, foram registrados biótipos de *Senecio vulgaris* resistentes ao herbicida simazina, uma triazina pertencente ao mecanismo de ação dos inibidores do Fotossistema II (HEAP, 2018). A partir de então, inúmeros casos de resistência foram e continuam sendo registrados mundialmente, ao longo dos anos.

Atualmente, existem 490 biótipos resistentes aos herbicidas mundialmente, envolvendo 256 espécies de plantas daninhas (HEAP, 2018). No Brasil, dentre as primeiras espécies com registro para resistência aos herbicidas, está *Bidens pilosa*, resistente aos inibidores da ALS, registrado em 1993 (HEAP, 2018). Atualmente no Brasil, existem 28 espécies registradas com resistência a algum herbicida, envolvendo principalmente as culturas de soja, algodão, milho, trigo e arroz irrigado (HEAP, 2018). Dentre todos os casos, destacam-se as espécies com resistência ao herbicida glifosato.

Embora o herbicida glifosato seja comercializado desde 1974 (VIDAL; MEROTTO JR, 2001), os primeiros relatos de plantas daninhas resistentes só surgiram em 1996, surpreendendo pesquisadores que, até então acreditavam que a resistência de plantas daninhas ao glifosato seria impossível de ocorrer (JASIENIUK, 1995). Três razões principais foram apresentadas para supertar esta hipótese: em primeiro lugar, o glifosato é lentamente metabolizado pelas plantas; o segundo ponto supunha que a super

expressão do gene EPSPs apenas conferiria resistência de baixo nível; e, em terceiro lugar, as mutações no gene EPSPs foram associadas com altas perdas de valor adaptativo pelos biótipos resistentes (JASIENIUK, 1995).

Mundialmente, estão relatadas 41 espécies resistentes ao glifosato, oito dessas relatadas no Brasil, sendo elas: *C. bonariensis*, *C. canadensis*, *C. sumatrensis*, *Digitaria insularis*, *Lolium multiflorum*, *Chloris elata*, *Amaranthus palmeri* e *Eleusine indica* (HEAP, 2018). Para *Euphorbia heterophylla*, em que foram testados biótipos com histórico de dificuldade de controle pelo glifosato em lavouras de soja, foi constatada a tolerância da espécie (VARGAS et al., 2011).

A resistência é a capacidade adquirida de uma planta em sobreviver e reproduzir-se após a aplicação de determinado herbicida que, sob condições normais, controla os demais integrantes da população (CHRISTOFFOLETI; NICOLAI, 2016; GAZZIERO et al., 2014). Já, a tolerância refere-se à capacidade inata da planta em sobreviver após o tratamento herbicida, relacionada à variabilidade genética natural da espécie (VARGAS et al., 2009).

A resistência de plantas daninhas a herbicidas ocorre de três formas principais: resistência simples, resistência cruzada e resistência múltipla. No caso de resistência simples, o biótipo é resistente a um único herbicida, devido a um único mecanismo de resistência. Já na resistência cruzada, o biótipo é resistente a dois ou mais herbicidas, com mesmo mecanismo de ação, no entanto, de grupos químicos distintos. O problema de maior complexidade e dificuldade de manejo é a resistência múltipla. Nos casos mais simples, a resistência múltipla confere resistência a dois ou mais herbicidas, com mecanismos de ação distintos, em função de um mecanismo de resistência, podendo em casos mais complexos, a resistência ser conferida por mais de um mecanismo de resistência (AGOSTINETTO; VARGAS, 2014).

As plantas daninhas podem sobreviver à aplicação de herbicidas devido a diversos fatores, os quais podem estar relacionados ou não ao local de ação do herbicida. Quando relacionado ao local de ação, a resistência pode ser decorrente da diminuição de afinidade do herbicida pelo local de ação na enzima, que resulta de uma mutação na sequência nucleotídica do DNA, ou devido à superexpressão desta enzima.

A resistência não relacionada ao local de ação pode ocorrer por mecanismos de redução da absorção, redução ou aumento da translocação, e aumento da metabolização e da compartimentalização do herbicida (POWLES; YU, 2010).

A resistência ocasionada por alteração no local de ação, é resultado de mutações em nível de DNA, ou seja, alteração ou alterações em uma ou mais bases nitrogenadas do gene da enzima, dando origem a uma enzima modificada, o que impede a ligação do herbicida, que assim perde sua funcionalidade. A alteração de uma única base nitrogenada, a qual resulta em mutação de ponto, pode gerar uma enzima com características funcionais diferentes da original (POWLES; YU, 2010).

A resistência devido à metabolização do herbicida ocorre pela capacidade da planta degradar a molécula herbicida mais rapidamente que plantas suscetíveis, tornando-as inativa (AGOSTINETTO; VARGAS, 2014; POWLES; YU, 2010). Os compostos inativados são normalmente mais hidrofílicos, menos móveis na planta e mais suscetíveis a compartimentalização do que a molécula original do herbicida (KRUEZ; TOMMASINI; MARTINOIA, 1996). A compartimentalização ou sequestro do herbicida ocorre pela conjugação da molécula com metabólitos da planta, tornando-a inativa, ou sendo removida das partes metabolicamente ativas da célula e armazenada em locais inativos, como o vacúolo ou ainda, presa na parede celular, impedindo sua atividade e translocação. Devido a conjugação e compartimentalização, a absorção e a translocação são alteradas e, assim a quantidade de herbicida que atinge o local de ação é bastante reduzida, não chegando a ser letal para a planta.

Em *Conyza canadensis*, foi relacionado aumento do sequestro do glifosato no vacúolo em condições de temperaturas superiores (20°C) em relação a inferiores (12°C) (GE et al., 2011). Grande família de genes de proteínas de transportes abc são comuns no genoma de plantas, requerendo ATP para suas funções e transportar uma variedade de pequenas moléculas através de membranas (REA, 2007; VERRIER et al., 2008). Sob temperaturas quentes, 85% do glifosato aplicado em buva resistente é sequestrado no vacúolo, e para o biótipo suscetível somente 15% do herbicida foi sequestrado (GE et al., 2011). Enquanto ambos os biótipos possuem a capacidade de transportar glifosato através da membrana do tonoplasto, este processo é mais eficiente em plantas

resistentes. A principal razão para este fato é a superexpressão dos genes que regulam as proteínas de transportadoras ATP-binding cassette (ABC) que são hábeis em transportar rapidamente o glifosato até o vacúolo sob condições de temperaturas superiores (GE et al., 2011).

Adicionalmente, inúmeros casos de resistência de plantas daninhas a glifosato não são relacionados com o local de ação do herbicida (POWLES; YU, 2010). Resistência a glifosato não relacionado com o local de ação do herbicida pode incluir reduzida absorção e translocação, compartimentalização vacuolar e rápida metabolização e detoxificação do herbicida (CARVALHO et al., 2012; GONZALEZ-TORRALVA et al., 2012; VILA-AIUB et al., 2012; YU; HUANG; POWLES, 2010). Uma vez que as plantas são limitadas em detoxificar compostos, elas desenvolvem estratégias para tal situação. Desta forma, as proteínas transportadoras ABC são responsáveis pelo transporte de compostos através de membranas (YUAN; TRANEL; STEWART, 2007). Proteínas transportadoras ABC além de serem transportadoras de hormônios, lipídeos, metais, e metabólitos secundários, também são responsáveis pelo transporte de herbicidas e seus metabólitos (KANG et al., 2011; KLEIN; BURLA; MARTINOIA, 2006).

Recentemente foi documentado que transportadores ABC são responsáveis pela compartimentalização do glifosato no vacúolo através da superexpressão dos genes que regulam a expressão destas proteínas (PENG et al., 2010). Da mesma forma, superexpressão do gene EPSPs está relacionado com o mecanismo de resistência ao glifosato (BAERSON, et al., 2002; DINELLI, et al., 2008). Desta forma, a dose do herbicida torna-se abaixo da letal para o controle da espécie. Assim, a regulação destes genes podem variar em função da temperatura, fotoperíodo e do estágio de desenvolvimento da planta.

O gênero *Conyza* inclui, aproximadamente, 50 espécies, as quais se distribuem em quase todo o mundo (KISSMANN; GROTH, 1999). As espécies que mais se destacam, por seu caráter negativo, são *C. bonariensis*, *C. canadensis* e *C. sumatrensis*. A primeira espécie é nativa da América do Sul e ocorre de forma abundante na Argentina, no Uruguai, no Paraguai e no Brasil. Neste, sua presença é mais intensa nas

regiões sul, sudeste e centro-oeste. Ela também está presente na Colômbia e na Venezuela, onde infesta lavouras de café (KISSMANN; GROTH, 1999).

C. canadensis, é nativa da América do Norte (FRANKTON; MULLIGAN, 1986), é uma das espécies mais amplamente distribuídas no mundo (THEBAUD; ABBOTT, 1995). É cosmopolita, sendo mais encontrada em zonas temperadas do hemisfério norte (HOLM et al., 1997) e regiões subtropicais do hemisfério sul, mas é pouco frequente em regiões tropicais (KISSMANN; GROTH, 1999). A espécie está presente em quase todas as regiões do Canadá (ROULEAU; LAMOUREUX, 1992), Estados Unidos (USDA, 1970), Oeste da Europa e planície mediterrânea (THEBAUD; ABBOTT, 1995), Austrália e Japão (HOLM et al. 1997). No Brasil, sua presença é significativa em campos nativos e em lavouras, especialmente da região sul (KISSMANN; GROTH, 1999). Já *C. sumatrensis*, é originária das Américas, mas se espalhou para as regiões mais quentes de todos os continentes (THEBAUD; ABBOTT, 1995).

As espécies são conhecidas popularmente por “buvas”, destacando-se por infestarem áreas abandonadas (terrenos baldios e margens de estradas), pastagens, culturas perenes (citros e café) e lavouras anuais (algodão, milho, soja e trigo) (THEBAUD; ABBOTT, 1995). Em termos mundiais, estas espécies daninhas infestam mais de 40 culturas (HOLM et al., 1997).

Diante de um cenário de aumento da ocorrência de casos de resistência de plantas daninhas a herbicidas, medidas que preconizam o manejo da resistência são fundamentais, sendo que o monitoramento constante da lavoura para identificação dos focos de resistência e eliminação das plantas suspeitas são importantes (HUGH, 2006; LAZAROTO; FLECK; VIDAL, 2008). Depois de identificada a resistência a campo, a adoção de práticas como rotação de culturas, misturas de herbicidas, aplicações localizadas e a associação de métodos de controle reduzem o impacto do problema (HUGH, 2006). O controle proativo de resistência com a utilização de herbicidas pré-emergentes pode levar a um custo 26% maior, no entanto, este aumento se justifica frente ao custo de controle reativo, quando as plantas são resistentes aos glifosato, onde

se faz necessário a mistura de herbicidas, tornando o custo 358% maior para viabilizar o cultivo livre da interferência de plantas daninhas resistentes (MUELLER et al., 2005).

No Brasil não existe levantamento de área infestada com buva resistente ao herbicida glifosato. A realização de levantamento de populações de buva com resistência a este herbicida é uma ferramenta que permite identificar os locais de ocorrência desta resistência e determinar estratégias de manejo específicas para cada região de acordo com suas características. De posse destas informações, a tomada de decisão e a adoção de estratégias de prevenção e controle da resistência se tornam aplicável, recuperando a viabilidade de cultivo nessas áreas.

O conhecimento das espécies resistentes e da extensão da área infestada fornece conhecimento da gravidade do problema e permite determinar o manejo da resistência e tornar o processo de seleção de biótipos resistentes mais lenta, auxiliando na tomada de decisões reativas no controle destas populações (OWEN; MARTINEZ; POWLES, 2014). Além disso, o mapeamento da resistência permite estabelecer os custos da resistência, definição de políticas públicas e assistência técnica direcionada.

Em razão do crescente aumento de populações de plantas de buva com resistência ao herbicida glifosato, a biologia molecular vem se tornando uma importante ferramenta para o seu conhecimento. Pesquisas relacionadas com a similaridade genética com o uso de marcadores moleculares de microssatélites em plantas daninhas permitem avaliar sua origem e dispersão.

Os marcadores moleculares microssatélites são repetições variáveis em *tandem* de uma pequena região de um a seis pares de nucleotídeos repetidos muitas vezes (JONES et al., 2009). Devido a alta taxa de mutações, essas regiões são de grande interesse na genética de populações. As mutações resultam de marcadores altamente polimórficos, permitindo discriminação genética de indivíduos proximamente relacionados, mesmo empregando um número relativamente baixo de marcadores microssatélite permite a distinção entre populações (VARSHNEY; GRANER; SORRELLS, 2005). Já a presença de múltiplos alelos por *locus* favorece a avaliação da diversidade genética entre populações e subpopulações mesmo em espécies com alto grau de autogamia (ZHANG et al., 2009).

A análise de marcadores microssatélites consiste em reações de PCR convencional, seguido pela verificação dos resultados em gel de agarose, poliacrilamida ou eletroforese capilar automatizada (MENKSEN; KAHL, 2005).

Os marcadores microssatélites apresentam algumas vantagens em suas análises, como: possuir expressão codominante; são hipervariáveis no que diz respeito ao número de alelos por locus e, por isso, têm se tornado uma fonte importante de marcadores genéticos polimórficos; são muito frequentes e distribuídos ao acaso ao longo de todo o genoma e a existência de conservação de sítios de microssatélites entre espécies relacionadas torna possível, em alguns casos, a utilização de iniciadores obtidos em uma espécie para outras espécies afins (iniciadores heterólogos). Contudo, há limitações nas análises de microssatélites, como: necessidade do desenvolvimento de iniciadores para cada espécie (ou grupos de espécies relacionadas), o que implica no sequenciamento prévio de partes específicas do DNA e não se conhece o papel funcional das sequências estudadas (FREITAS; BERED, 2003).

Neste contexto, a introdução de técnicas moleculares para caracterizar populações de plantas daninhas é um processo atual e, apesar de ainda não ser reconhecida como metodologia oficial, vem sendo fortalecida em função do alto grau de precisão e informação que pode ser obtido pelo *fingerprinting* molecular. O *fingerprinting* ou genotipagem molecular é a impressão digital de um determinado genótipo, que permite a obtenção de seu perfil genético e sua diferenciação inequívoca de outro genótipo (GUIMARÃES et al., 2004). Esta estratégia tem sido utilizada para mapeamento de ligação do genoma, teste de identidade de cultivares, determinação da relação de parentesco e da variação genética, análise de populações e de pedigree, localização de loco para doenças e epidemiologia (BRAMMER, 2000).

A ocorrência de populações de buva resistentes em diversas regiões do Brasil nos leva a crer que há a possibilidade da ocorrência de elevada similaridade genética entre essas populações, uma vez que o principal método de dispersão de sementes de buva é através do vento, além da contaminação de maquinários e/ou lotes de sementes. Assim o estudo de similaridade genética entre as populações de buva tonará a

elucidação da dispersão da resistência mais clara, auxiliando na tomada de medidas de controle a fim de interferir na evolução da resistência.

O glifosato é herbicida que atua inibindo a enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetase (EPSPs), impedindo a biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, necessários para a síntese de proteínas, ocasionando o aumento do ácido chiquímico, esse relacionado com o declínio de produtos intermediários da fixação de carbono e a redução da fotossíntese (DUKE; POWLES, 2008).

A eficácia do glifosato é dependente de processos como a retenção da molécula na superfície foliar, a penetração foliar, a translocação na planta até o sítio de ação e inibição da enzima alvo, a epsps., onde o produto vai exercer sua atividade herbicida (SATICHIVI et al., 2000). A translocação representa processo essencial para a eficácia do herbicida (SATICHIVI et al., 2000); assim qualquer impedimento pode resultar em grandes prejuízos na eficiência de controle da espécie alvo.

O glifosato movimenta-se no floema seguindo a rota dos produtos da fotossíntese, das folhas fotossinteticamente ativas em direção às partes da planta em crescimento, para manutenção do metabolismo e/ ou formação de produtos de reserva, das raízes, dos tubérculos, das folhas jovens e de zonas meristemáticas (HETHERINGTON et al., 1998). Desta forma a absorção, a translocação e o metabolismo do herbicida podem afetar a sensibilidade da planta, pois este precisa atingir o sítio de ação numa concentração adequada (FERREIRA et al., 2006). O estágio de desenvolvimento da planta também altera a eficácia do herbicida, uma vez que ela tem diferentes prioridades para a condução dos seus fotoassimilados via floema.

Assim, a análise de espessura da epiderme, bem como o diâmetro dos feixes vasculares entre biótipos suscetíveis e resistentes pode ser alternativa viável uma vez que sua alteração pode alterar a quantidade do herbicida absorvido reduzindo a sua ação herbicida. Considerando os aspectos mencionados, a realização da descrição anatômica das folhas de biótipos de *Conyza* spp. resistentes e suscetíveis ao glifosato, a fim de verificar se uma possível alteração morfológica possui efeito na translocação e no armazenamento e, conseqüentemente, na sensibilidade ao herbicida.

Desta forma, a identificação dos processos fisiológicos, moleculares e genéticos envolvidos na resistência de *Conyza* spp. ao herbicida glifosato e sua relação com fatores geográficos, poderá tornar viável a pesquisa de diferentes ferramentas que possam auxiliar nas medidas de manejo e na redução da população e disseminação da resistência.

Nesse contexto, o objetivo geral desse trabalho foi elucidar a base molecular, genética e anatômica da resistência de *Conyza sumatrensis* ao glifosato. Ainda, os objetivos específicos foram: Determinar a distribuição geográfica da resistência de *Conyza* spp. ao herbicida glifosato; identificar as alternativas químicas para o controle de buva resistente ao glifosato, aplicadas em diferentes estádios de desenvolvimento da planta daninha; Realizar a descrição anatômica da folha de biótipos resistentes e suscetível ao herbicida glifosato, com vistas a identificar possíveis alterações que possam alterar a absorção e/ou translocação do herbicida; Analisar a similaridade genética em biótipos de *C. sumatrensis*, oriundos de diferentes regiões do Brasil, analisando o polimorfismo de locos microssatélites; e Investigar o mecanismo de resistência de biótipos de *C. sumatrensis* resistente e suscetível ao herbicida glifosato, através da determinação dos níveis de expressão dos genes constitutivos *EPSPs*, *M11* e *M7*.

3 CAPÍTULO I

Distribuição geográfica de *Conyza* spp. resistente ao herbicida glifosato nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul.

3.1 Resumo

Conyza spp. é uma planta daninha de ciclo anual, presente em diversas culturas agrícolas. A espécie naturalmente é controlada pelo herbicida glifosato, no entanto, o uso continuado deste produto selecionou populações resistentes. Frente ao exposto, objetivou-se avaliar a distribuição geográfica dos biótipos de buva resistente ao herbicida glifosato nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul. Sementes de plantas de *Conyza* spp. que sobreviveram a aplicações de glifosato, foram coletadas nas regiões produtoras de soja dos estados acima citados, totalizando 137 amostras de 37 municípios. Sementes dos biótipos foram semeadas e submetidas ao tratamento de 1440g e.a. ha⁻¹ de glifosato, quando atingiram o estágio de quatro a seis folhas. De acordo com os resultados, dos biótipos de *Conyza* spp. coletados, 108 não foram controladas pelo glifosato, apresentando resistência a este herbicidas, e 29 foram controladas pela aplicação do herbicida. Desta forma, 78% da população de *Conyza* spp. estudada possui resistência ao glifosato, e 22% ainda apresenta suscetibilidade. Dentre os biótipos oriundos dos três Estados, no Paraná, 83% apresentaram resistência, no Rio Grande do Sul e Mato grosso do Sul, 77% dos biótipos apresentaram resistência. Assim, conclui-se que a maior parte da população de *Conyza* spp. é resistente ao glifosato, e mesmo com a ocorrência desta resistência, a aplicação deste herbicida deve ser mantida aliado a outros herbicidas com distintos mecanismos de ação e práticas de manejo, objetivando o controle de plantas suscetíveis deste gênero, além de outras espécies de plantas daninhas presentes nas áreas agrícolas.

Palavras-chave: 1. *Conyza bonariensis*. 2. *Conyza sumatrensis*. 3. *Conyza canadensis*. 4. Resistência. 5. Controle químico.

3.2 Abstract

Conyza spp. is an annual cycle weed, present in many crops. The species is naturally controlled by the herbicide glyphosate, however, continued use of this product has selected resistant populations. The objective of this study was to evaluate the geographic distribution of the *Conyza* spp. biotypes resistant to glyphosate herbicide in Rio Grande do Sul, Paraná and Mato Grosso do Sul states. Seeds of *Conyza* spp. which survived glyphosate applications, were collected in the soybean producing regions of the states mentioned above, totaling 137 samples from 37 municipalities. Seeds of the biotypes were sown and treated with 1440g ha⁻¹ of glyphosate when they reached the four to six leaf stage. According to the results, the biotypes of *Conyza* spp. 108 were not controlled by glyphosate, being resistant to this herbicide, and 29 were controlled by herbicide application. Thus, 78% of the population of *Conyza* spp. studied has resistance to glyphosate, and 22% still shows susceptibility. Among the biotypes from the three states, in Paraná, 83% presented resistance, in Rio Grande do Sul and Mato Grosso do Sul, 77% of the biotypes presented resistance. Thus, it is concluded that most of the population of *Conyza* spp. is resistant to glyphosate, and even with the occurrence of this resistance, the application of this herbicide must be kept in association with other herbicides with different mechanisms of action and management practices, aiming the control of susceptible plants of this genus, in addition to other weed species present in the agricultural areas.

Key-words: 1. *Conyza bonariensis*. 2. *Conyza sumatrensis*. 3. *Conyza canadensis*. 4. Resistência. 5. Controle químico.

3.3 Introdução

A produção mundial de grãos com trigo, arroz, soja, milho, dentre outras, são essenciais para o abastecimento mundial de alimentos, e quaisquer ameaça a produção, compromete a segurança alimentar. As plantas daninhas que infestam estas culturas

ameaçam a produtividade das culturas. Os herbicidas são alternativas eficazes e dominam o controle de plantas daninhas nessas culturas agrícolas. No entanto, uma repercussão biológica da dependência excessiva de herbicidas é a evolução de populações de plantas daninhas com resistência a herbicidas. Mundialmente, 252 espécies de plantas daninhas apresentam resistência a herbicidas, totalizando 479 casos. (HEAP, 2018).

O gênero *Conyza* inclui, aproximadamente, 50 espécies, as quais se distribuem em quase todo o mundo (KISSAMANN; GROTH, 1999). As espécies que mais se destacam, por seu caráter negativo, são *C. bonariensis*, *C. canadensis* e *C. sumatrensis*. As espécies são conhecidas popularmente por “buvas”, destacando-se por infestarem áreas abandonadas, pastagens, culturas perenes e áreas com culturas anuais (THEBAUD; ABBOTT, 1995).

No sistema de semeadura direta ou em pomares, o controle de buva é normalmente realizado com a aplicação de herbicidas não-seletivos, sendo o glifosato o mais utilizado. No entanto, com a ocorrência de resistência a este herbicida, existe a evidente necessidade da associação com outros herbicidas mecanismos de ação diferentes, objetivando contornar o problema de resistência e ao mesmo tempo proteger outros ingredientes ativos. O uso intensivo do glifosato para esse fim deve-se a sua alta eficiência, em diferentes estágios vegetativos das espécies, combinado ao seu custo baixo comparado aos demais herbicidas (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2003). No entanto, o uso intensivo de um herbicida impõe alta pressão de seleção sobre a população de plantas resultando na seleção de biótipos resistentes preexistentes na população (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2003; POWLES; YU, 2010; VARGAS et al., 2009). No ano de 2005, o uso repetido de glifosato tanto em dessecação, como em pós-emergência da cultura da soja, selecionou biótipos de buva (*Conyza bonariensis*) resistentes a este herbicida (HEAP, 2018).

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é um processo evolucionário, e a dinâmica e o impacto são dependentes de diversos fatores. Os fatores capazes de determinar como a resistência é impulsionada são a diversidade genética da população,

a existência de genes de resistência a um herbicida específico e fatores operacionais (POWLES; YU, 2010).

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é um problema de caráter mundial. No Brasil, nos últimos anos, ganhou importância devido ao surgimento de inúmeros casos de espécies resistentes a diferentes mecanismos de ação herbicida. No Brasil destacam-se as espécies com resistência ao glifosato *Conyza bonariensis*, *C. sumatrensis*, *C. canadensis*, *Lolium multiflorum*, *Digitaria insularis*, *Chloris elata*, *Amaranthus palmeri* e *Eleusine indica* (HEAP, 2018). Ainda, *C. sumatrensis*, apresenta resistência simples ao herbicida paraquate, saflufenacil, clorimuron, e resistência múltipla ao glifosato e clorimuron; e glifosato, clorimuron e paraquate (HEAP, 2018). Em nível mundial, as três espécies de buva apresentam resistência a quatro mecanismos de ação herbicida (HEAP, 2018).

Diante de um cenário de aumento da ocorrência de casos de resistência de plantas daninhas a herbicidas, medidas que preconizam o manejo da resistência são fundamentais, sendo que o monitoramento constante da área para identificação dos focos de resistência e eliminação das plantas suspeitas é importante (HUGH, 2006; LAZAROTO; FLECK; VIDAL, 2008). Depois de identificada a resistência a campo, a adoção de práticas como rotação de culturas, misturas de herbicidas, aplicações localizadas e a associação de métodos de controle reduzem o impacto do problema (HUGH, 2006). O impacto econômico da resistência de plantas daninhas pode em muitos casos triplicar em relação a áreas sem a ocorrência de resistência. O controle de plantas daninhas em área sem a ocorrência de resistência apresenta custo médio de R\$120,00, já em áreas com buva e capim amargoso resistentes aos mecanismos de ação epsps, als e accase, este custo médio de controle passa para R\$386,65, sendo este 222% superior em relação a ausência de resistência (ADEGAS et al., 2017). Desta forma, presume-se que o monitoramento da resistência como ferramenta proativa, apresenta-se como importante ferramenta a ser implementada pela cadeia envolvida neste setor.

O conhecimento da extensão da área infestada fornece conhecimento da gravidade do problema e permite determinar o manejo da resistência e tornar o processo de seleção de biótipos resistentes mais lento, auxiliando na tomada de decisões reativas

no controle destas populações (OWEN; MARTINEZ; POWLES, 2014). Além disso, o mapeamento das resistências permite estabelecer os custos da resistência, definição de políticas públicas e assistência técnica específicas a cada produtor.

No Brasil, existe o levantamento da frequência e dispersão da resistência de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) ao glifosato (LÓPEZ-OVEJERO et al., 2017). No entanto, não há este levantamento de área infestada com buva (*Conyza* spp.) resistente ao glifosato. A realização de levantamento de populações de buva com resistência ao herbicida glifosato é importante ferramenta que permitirá identificar os locais de ocorrência desta resistência e determinar estratégias de manejo específicas para cada região de acordo com suas características. De posse destas informações, a tomada de decisão e a adoção de estratégias de prevenção e controle da resistência se tornam aplicável, recuperando a viabilidade de cultivo nessas áreas.

O presente trabalho teve como hipóteses que a distribuição da resistência de buva ao glifosato compreende grande parte da região produtora de soja do Brasil. Desta forma, objetivou-se avaliar a distribuição geográfica dos biótipos de buva resistente ao herbicida glifosato nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul.

3.4 Material e Métodos

Para a realização do trabalho, foram coletadas sementes de plantas de *Conyza* spp. em áreas com histórico de aplicações de glifosato na dessecação das plantas daninhas e de cultivo de soja *Roundup Ready* (RR), com observações dos produtores em relação à falta de controle das mesmas após o uso de glifosato. Cada planta foi colocada individualmente em saco de papel para não acontecer a mistura das sementes dos diferentes locais de coleta.

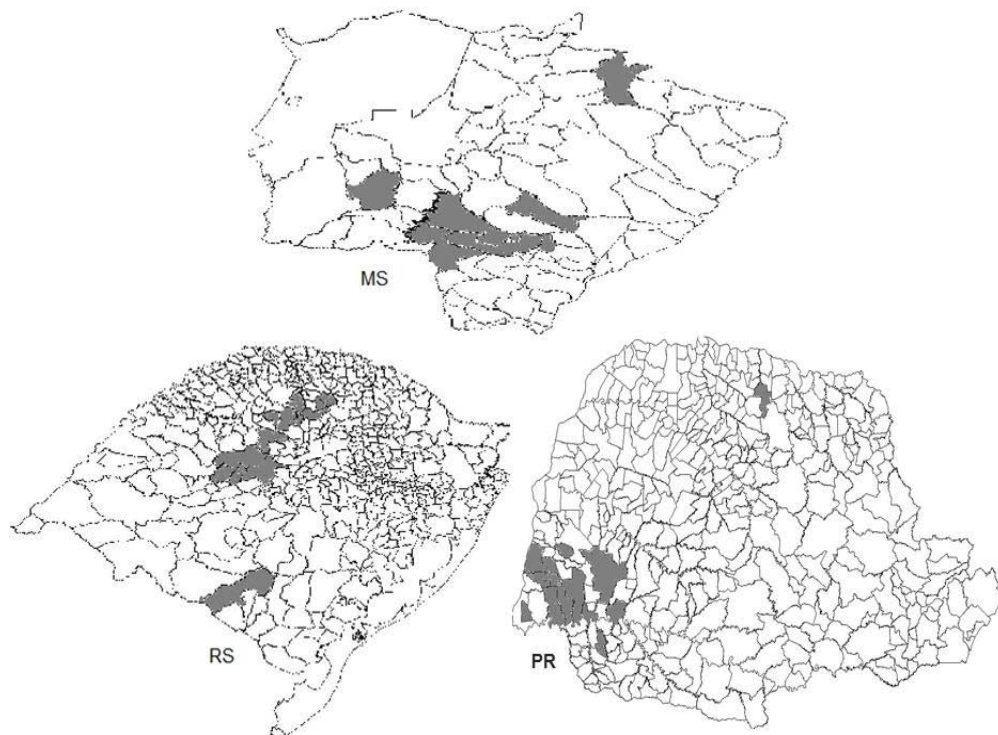
As sementes foram coletadas em municípios dos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul. A coleta das sementes ocorreu em propriedades nos seguintes Estados, municípios e número de biótipos por município. Rio Grande do Sul: Bagé (5), Carazinho (4), Chapada (2), Coqueiros do Sul (2), Cruz Alta (5), Jari (11), Julio de Castilhos (6), Panambi (2), Pontão (3), Quevedos (5), Saldanha Marinho (2),

Santa Bárbara do Sul (3), Tio Hugo (1), Tupanciretã (10); Paraná: Cambé (2), Capitão Leonidas Marques (3), Cascavel (4) Céu Azul (1), Diamante do Oeste (1), Matelândia (1), Medianeira (1), Missal (9), Ouro Verde (1), Romilândia (1), Santa Izabel do Oeste (3), Santa Helena (1), Santa Terezinha de Itaipú (1), Serranópolis do Iguaçu (1) e Três Barras (1); Mato Grosso do Sul: Bonito (10), Costa Rica (1), Douradina (1), Dourados (2), Indápolis (1), Itaporã (2), Maracaju (12) Nova Alvorada do Sul (5) e Ponta Porã (11) (Figura 1), totalizando 137 amostras de sementes coletadas em 37 municípios, em três Estados.

Após as coletas as sementes foram limpas, identificadas e armazenadas até o momento de serem utilizadas em experimentos. O experimento, realizado para confirmação da resistência, foi realizado entre Abril e Julho de 2016, em casa de vegetação da Universidade de Passo Fundo, no município de Passo Fundo-RS, em delineamento inteiramente casualizado. As sementes de cada biótipo foram colocadas em copos plásticos, submersas em água e armazenadas em geladeira a temperatura de 5° C durante 24hs, posteriormente foram semeadas. Os tratamentos contaram dos biótipos de buva com suspeita de resistência e a aplicação do herbicida glifosato a 1440g e.a. ha⁻¹, representando a máxima dose de registro, para o controle de buva em pré-semeadura de soja (dessecação) (AGROFIT, 2018). Como produto comercial foi utilizado Glifosato Nortox®. As unidades experimentais constituíram-se de vasos plásticos, com capacidade volumétrica de 500mL, contendo substrato comercial, sendo compostas por três plantas vaso⁻¹.

Quando as plantas atingiram o estágio de quatro a seis folhas, foi aplicado o herbicida, utilizando-se pulverizador costal, pressurizado a CO₂, calibrado para proporcionar volume de aplicação de 150L ha⁻¹ de calda herbicida, equipado com pontas de pulverização do tipo leque 110.015.

Figura 1 – Localização geográfica dos municípios onde foi realizada coleta de sementes de plantas de buva com suspeita de resistência ao herbicida glifosato nos Estados do Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR) e Mato Grosso do Sul (MS). Adaptado de Mapas para Colorir, 2017



Fonte: Dados do autor.

A variável avaliada foi controle visual aos 30 dias após a aplicação do tratamento (DAT), sendo os biótipos identificados de acordo com a resposta aos herbicidas como suscetíveis ou resistentes, adotando-se escala binária onde zero (0) representou a suscetibilidade das plantas e um (1) resistente. Os dados obtidos foram analisados por estatística descritiva, procurando-se estabelecer relações entre a distribuição de casos de buva com suspeita de resistência ao herbicida glifosato.

3.5 Resultados e Discussão

A análise dos dados revelou que dos 137 biótipos coletados, 108 biótipos não foram controlados pela aplicação de 1440g e.a. ha⁻¹ de glifosato, evidenciando a

ocorrência de resistência a este herbicida (Tabela 1). No entanto, 29 biótipos não sobreviveram à aplicação da mesma dose do herbicida, o que revelou a existência de indivíduos suscetíveis dentro da população de buva (Tabela 1). Desta forma, 78% da população de buva avaliada neste trabalho apresentou resistência ao glifosato e somente 22% ainda foi suscetível a este herbicida.

Tabela 1 – Localização e resposta (0=suscetível, 1= resistente) de biótipos de *Conyza* spp. com suspeita de resistência, em função da aplicação de 1440g e.a. ha⁻¹ de glifosato avaliado visualmente aos 30 dias após o tratamento (DAT). Passo Fundo - 2016

Biótipo	Estado	Município	Resposta ao Glifosato
BAG 01		Bagé	1
BAG 02		Bagé	0
BAG 03		Bagé	1
BAG 04		Bagé	1
BAG 05		Bagé	1
CAR 01		Carazinho	1
CAR 02		Carazinho	1
CAR 03		Carazinho	1
CAR 04		Carazinho	1
CHAP 01		Chapada	1
CHAP 02		Chapada	1
COQ 01		Coqueiros do Sul	1
COQ 02		Coqueiros do Sul	1
CRA 01		Cruz Alta	1
CRA 02		Cruz Alta	1
CRA 03		Cruz Alta	0
CRA 04		Cruz Alta	1
CRA 05		Cruz Alta	1
JAR 01		Jari	1
JAR 02		Jari	0
JAR 03		Jari	0
JAR 04		Jari	1
JAR 05	Rio Grande do Sul	Jari	1
JAR 06		Jari	1
JAR 07		Jari	0
JAR 08		Jari	1
JAR 09		Jari	1

JAR 10		Jari	1
JAR 11		Jari	0
JUC 01		Julio de Castilhos	0
JUC 02		Julio de Castilhos	0
JUC 03		Julio de Castilhos	1
JUC 04		Julio de Castilhos	1
JUC 05		Julio de Castilhos	1
JUC 06		Julio de Castilhos	1
PAN 01		Panambi	1
PAN 02		Panambi	1
PON 01		Pontão	1
PON 02		Pontão	0
PON 03		Pontão (SUS)	0
QUEV 01		Quevedos	1
QUEV 02		Quevedos	1
QUEV 03		Quevedos	0
QUEV 04		Quevedos	1
QUEV 05		Quevedos	0
SAM 01		Saldanha Marinho	1
SAM 02		Saldanha Marinho	1
SAB 01		Santa Bárbara do Sul	1
SAB 02		Santa Bárbara do Sul	1
SAB 03		Santa Bárbara do Sul	1
TIH 01		Tio Hugo	1
TUP 01		Tupanciretã	1
TUP 02		Tupanciretã	1
TUP 03		Tupanciretã	1
TUP 04		Tupanciretã	1
TUP 05		Tupanciretã	0
TUP 06		Tupanciretã	1
TUP 07		Tupanciretã	0
TUP 08		Tupanciretã	1
TUP 09		Tupanciretã	1
TUP 10		Tupanciretã	1
CAM 01		Cambé	0
CAM 02		Cambé	1
CLM 01		Capitão Leonidas Marques	1
CLM 02		Capitão Leonidas Marques	0
CLM 03	Paraná	Capitão Leonidas Marques	1
CAS 01		Cascavel	1
CAS 02		Cascavel	1
CAS 03		Cascavel	1
CAS 04		Cascavel	1

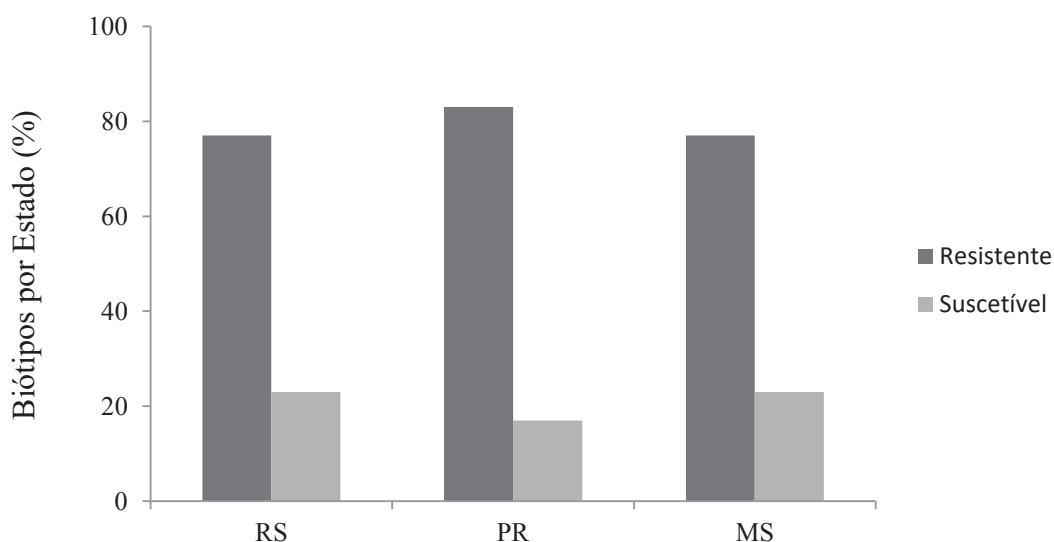
CEA 01		Céu Azul	1
DIO 01		Diamante do Oeste	1
MAT 01		Matelândia	1
MED 01		Medianeira	1
MIS 01		Missal	1
MIS 02		Missal	1
MIS 03		Missal	1
MIS 04		Missal	1
MIS 05		Missal	1
MIS 06		Missal	1
MIS 07		Missal	1
MIS 08		Missal	1
MIS 09		Missal	0
OUV 01		Ouro Verde	1
ROM 01		Romilândia	1
SIO 01		Santa Izabel do Oeste	1
SIO 02		Santa Izabel do Oeste	0
SIO 03		Santa Izabel do Oeste	1
SAH 01		Santa Helena	1
STI 01		Santa Terezinha de Itaipu	1
SEI 01		Serranópolis do Iguaçu	0
TRB 01		Três Barras	1
BON 01		Bonito	0
BON 02		Bonito	1
BON 03		Bonito	1
BON 04		Bonito	1
BON 05		Bonito	1
BON 06		Bonito	1
BON 07		Bonito	1
BON 08		Bonito	1
BON 09		Bonito	0
BON 10		Bonito	1
COR 01		Costa Rica	0
DOU 01		Douradina	1
DOU 01		Dourados	1
DOU 02		Dourados	0
IND 01	Mato Grosso do Sul	Indápolis	1
ITA 01		Itaporã	1
ITA 02		Itaporã	1
MAR 01		Maracaju	1
MAR 02		Maracaju	1
MAR 03		Maracaju	1
MAR 04		Maracaju	1

MAR 05	Maracaju	1
MAR 06	Maracaju	1
MAR 07	Maracaju	1
MAR 08	Maracaju	1
MAR 09	Maracaju	1
MAR 10	Maracaju	1
MAR 11	Maracaju	1
MAR 12	Maracaju	1
NAS 01	Nova Alvorada do Sul	1
NAS 02	Nova Alvorada do Sul	1
NAS 03	Nova Alvorada do Sul	1
NAS 04	Nova Alvorada do Sul	0
NAS 05	Nova Alvorada do Sul	1
POP 01	Ponta Porã	0
POP 02	Ponta Porã	0
POP 03	Ponta Porã	0
POP 04	Ponta Porã	1
POP 05	Ponta Porã	0
POP 06	Ponta Porã	1
POP 07	Ponta Porã	1
POP 08	Ponta Porã	0
POP 09	Ponta Porã	1
POP 10	Ponta Porã	1
POP 11	Ponta Porã	1

Fonte: Dados do autor.

Quando se faz a análise em cada estado, os resultados revelam que no Paraná é onde existe o maior percentual de biótipos resistentes (83%), sendo que Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul apresentaram 77% dos biótipos testados com resistência (Figura 2). Não existe uma forma de relacionar a ocorrência da resistência com o local de identificação do primeiro relato. Desta forma, os resultados tornam-se mais atrativos, uma vez que no Rio Grande do Sul foi onde ocorreu o primeiro relato de resistência de buva ao glifosato, e os resultados deste levantamento indicam que a proporção da resistência é similar entre os três Estados.

Figura 2 – Percentual de biótipos resistentes e suscetíveis ao herbicida glifosato em cada Estado estudado, Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR) e Mato Grosso do Sul (MS). Passo Fundo – 2017



Fonte: Dados do autor.

A utilização da máxima dose de registro do herbicida deve-se ao fato de que uma planta somente pode ser classificada como resistente a herbicida, se ela sobreviver e se reproduzir após a exposição da máxima dose de registro do produto para o controle da espécie, obedecido os critérios de aplicação (estádio vegetativo indicado, condições de clima, entre outros) (GAZZIERO et al., 2014; OWEN; POWLES, 2010).

Os 29 biótipos que não sobreviveram à aplicação são oriundos das mesmas regiões onde ocorreram biótipos resistentes, não havendo relação geográfica entre os biótipos suscetíveis e resistentes. Assim, com a confirmação de populações de buva suscetíveis ao glifosato, ressaltasse a importância e viabilidade da utilização do glifosato em rotação a outros herbicidas de mecanismos de ação distintos. A continuação da utilização do glifosato em associação a outros herbicidas deve ser mantida devido as importantes características que este herbicida apresenta como ação em outras espécies de plantas daninhas, aliado a efeitos sinérgicos e/ou aditivos destas associações. Mesmo

em áreas com a ocorrência de populações com resistência, este raciocínio deve ser seguido, uma vez que na mesma área possa haver indivíduos resistentes e suscetíveis, e outras espécies que o glifosato apresenta controle satisfatório.

As falhas de controle de buva observadas em áreas com aplicação de glifosato, em lavouras de soja e milho, e o resultado deste estudo evidenciam a larga extensão geográfica da resistência de buva ao herbicida glifosato. As buvas possuem grande capacidade de dispersão a longas distâncias, o que facilita a dispersão da resistência para diferentes regiões geográficas. As sementes de buva possuem estruturas denominadas *papus*, que podem medir até duas vezes o tamanho da semente, fazendo com que a semente paire no ar por longo período de tempo (ANDERSEN, 1993; REGEHR; BAZZAZ, 1979).

Embora o cultivo de soja RR tenha sido aprovado no Brasil em 2005, informalmente sabe-se que entre 1998 e 2005 cultivou-se soja RR irregularmente, principalmente no Estado do Rio Grande do Sul. Desta forma, o controle de plantas daninhas na cultura da soja passou a ser realizado quase que exclusivamente com glifosato. Desta forma, a seleção de biótipos resistentes ocorreu de maneira elevada, vindo a confirmar-se no ano de 2005 o primeiro relato de buva resistente a glifosato, fato este ocorrido no Rio Grande do Sul (HEAP, 2018).

Frente a isto, embora este trabalho não contemple populações de buva oriundas de toda a região produtora de soja do Brasil, o número e a localização geográfica das populações estudadas revela que a distribuição de buva resistente a glifosato é extensa e compreende grande parte da região produtora. Assim, pode-se até mesmo inferir que a distribuição da resistência é ainda maior do que a determinada neste trabalho. Os Estados do Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR) e Mato Grosso do Sul (MT), apresentam significância na produção brasileira de soja. Em 2017 a área cultivada com soja no RS, PR E MS foram respectivamente de 5.570, 5.250 e 2.520 milhões de hectares, apresentando produção de 18.714, 19.534 e 9.071 milhões de toneladas. (CONAB, 2017). Desta forma, o estudo da área com a ocorrência de populações de buva com resistência ao glifosato nestes estados se justifica, pois somente estes três estados representam 40% do volume de soja produzido no Brasil.

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é um processo evolutivo a partir de genes pré-existentes na natureza, influenciado pela biologia da espécie, fatores genéticos e relacionados com o herbicida em questão (MAXWELL; MORTIMER, 1994), dentre eles, a pressão exercida pela taxa de aplicação de herbicidas é um importante fator de seleção de biótipos resistentes (POWLES; YU, 2010).

Além do aumento da dependência de herbicidas no manejo seja em dessecação ou pós-emergência, a evolução da resistência de buva ao glifosato pode ser auxiliada por diversos outros fatores, tais como fluxo gênico, movimento de sementes através de máquinas agrícolas e lotes de sementes de culturas contaminados com sementes de buva (BARROSO; NAVARRETE; SANCHEZ, 2006; BUSI; BARRET-LENNARD; POWLES, 2008; MICHAEL; OWEN; POWLES, 2010).

Alternativamente ao glifosato, vários outros herbicidas de diferentes mecanismos de ação (2,4-D, saflufenacil, paraquate, atrazina, glufosinato, diclosulan, dentre outros) permanecem efetivos no controle de buva, embora a seleção da resistência a estes herbicidas seja constante. Com a recente identificação de resistência de buva ao paraquate e saflufenacil, as alternativas empregadas no manejo da resistência ao glifosato devem ser mantidas e enfatizadas, uma vez que o impacto desses últimos casos irá agravar o cenário no manejo de plantas daninhas resistentes. As práticas agronômicas, como rotação de culturas, integração de métodos de controle de plantas daninhas, associadas a rotação de mecanismo de ação de herbicidas, apesar de já serem empregadas, necessitam cada vez mais de fomento. Assim, essa ampla gama de opções de manejo integrado de buva consiga alcançar a sustentabilidade dos herbicidas, e portanto, a produtividade dos sistemas.

Assim, de acordo com os resultados obtidos, confirma-se a hipótese da ocorrência da resistência de buva ao glifosato em grande parte da região produtora de soja no Brasil estudada neste trabalho. Entretanto, deve se salientar que medidas eficientes de manejo sejam adotadas de maneira extremamente eficiente para que esta situação não se inverta para outros importantes herbicidas utilizados como ferramenta de manejo.

Considerando os resultados obtidos neste trabalho fica evidente a necessidade de avaliação da ocorrência de resistência de buva ao glifosato do ponto de vista econômico e político. Estes resultados poderão servir de subsídio para a elaboração de políticas públicas com atenção dirigida ao a evolução da resistência de plantas daninhas aos herbicidas. Pois certamente, grande parte do rendimento de grãos é reduzido em função da ocorrência da resistência, e até mesmo o custo financeiro com o controle destas populações (ADEGAS et al., 2017), é elevada em função da ocorrência da resistência. Ainda, ressalta-se a importância da manutenção do herbicida glifosato no sistema, aliado a outros herbicidas com diferentes mecanismos de ação e a integração de várias estratégias no manejo integrado de plantas daninhas, ainda, faz-se necessário a integração estratégica e segura de práticas de manejo desta planta daninha.

3.6 Conclusões

Dos 137 avaliados, 78% apresenta resistência ao glifosato e 22% é suscetível. Ainda, 83% dos biótipos oriundos do Paraná e 77% do Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul são resistentes.

Estes resultados confirmam a elevada distribuição geográfica da resistência de buva ao herbicida glifosato nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul, sendo uniforme nos três Estados.

4 CAPÍTULO II

Desempenho de herbicidas no controle de *Conyza* spp. em três estaturas da planta daninha.

4.1 Resumo

O uso intensivo do herbicida glifosato tanto em dessecação como em pós-emergência da cultura da soja, selecionou populações de *Conyza* spp. resistentes a este herbicida, desta forma, existe a necessidade da indicação de herbicidas alternativos bem como o estágio de desenvolvimento adequado para o controle dessas populações resistentes. Diante disso, o objetivo desta pesquisa foi identificar as alternativas químicas para o controle de buva resistente ao glifosato, aplicadas em diferentes estaturas da planta daninha. Para isso, foram conduzidos dois experimentos a campo, no município de Cruz Alta, nos anos agrícolas 2016/17 e 2017/18. Os tratamentos avaliados foram: glifosato (540 g e.a. ha⁻¹), glifosato (1080 g e.a. ha⁻¹), glifosato (2160 g e.a. ha⁻¹), glifosato (3240 g e.a. ha⁻¹), glifosato + 2,4-D (1080 + 1005 g e.a. ha⁻¹), glifosato + saflufenacil (1080 + 49 g e.a./i.a. ha⁻¹), paraquate (400 g i.a. ha⁻¹), diquate (400 g i.a. ha⁻¹), Glufosinato de amônio (600 g i.a. ha⁻¹) e testemunha sem aplicação, aplicados em três estaturas da planta daninha, sendo eles: plantas com no máximo 5 cm; plantas entre 6 e 15 cm; e plantas entre 16 e 25 cm. Os resultados evidenciaram que nenhuma dose do herbicida glifosato controlou as plantas daninhas, e com exceção do 2,4-D que necessita de complemento com aplicação sequencial de outro herbicida de contato, todas as alternativas apresentaram-se viáveis para o controle de plantas de *Conyza* spp. com no máximo 5 cm de estatura.

Palavras-chave: 1. Buva. 2. Resistência. 3. Estádio de aplicação.; 4. Controle alternativo.

4.2 Abstract

The intensive use of the glyphosate herbicide both in burndown and post emergence of the soybean crop, selected populations of *Conyza* spp. resistant to this herbicide, in this way, there is a need for the indication of alternative herbicides as well as the stage of development adequate for the control of these resistant populations. Therefore, the objective of this research was to identify the chemical alternatives to control of glyphosate resistant populations, applied at different weed height. For that, two experiments were conducted in the field, in Cruz Alta city, in the agricultural years 2016/17 and 2017/18. The treatments evaluated were: glyphosate (540 g a.e. ha⁻¹), glyphosate (1080 g a.e. ha⁻¹), glyphosate (2160 g a.e. ha⁻¹), glyphosate (3240 g a.e. ha⁻¹), glyphosate + 2,4-D (1080 + 1005 g a.e. ha⁻¹), glyphosate + saflufenacil (1080 + 49 g a.e./a.i. ha⁻¹), paraquat (400 g a.i. ha⁻¹), Diquat (400 g a.i. ha⁻¹), Glufosinate (600 g a.i. ha⁻¹), and check without application, applied in three weed heights, being: plants with a maximum of 5 cm; plants between 6 and 15 cm; and plants between 16 and 25 cm. The results showed that no dose of the herbicide glyphosate controlled weeds, and with the exception of 2,4-D that requires complement with sequential application of another contact herbicide, all alternatives were viable for the control of *Conyza* spp. with a maximum height of 5 cm.

Key-words: 1. Horseweed. 2. Resistance. 3. Stage os application. 4. Alternative control.

4.3 Introdução

O manejo de plantas daninhas em soja foi facilitado desde a introdução da tecnologia Roundup Ready® (RR) que confere resistência ao herbicida glifosato. Entretanto, o uso exclusivo deste herbicida de forma continuada e por mais de duas vezes durante a estação de cultivo, selecionou plantas daninhas com resistência (HEAP, 2018; NOHATTO, 2010; VARGAS et al., 2007).

O gênero *Conyza* inclui aproximadamente 50 espécies, as quais se distribuem em quase todo o mundo (KISSMANN; GROTH, 1999). As espécies que mais se destacam, por seu caráter negativo são *C. bonariensis*, *C. canadensis* e *C. sumatrensis*,

popularmente conhecidas como “buvas”. Essas espécies apresentam aumento gradativo de infestação nas áreas agrícolas do Brasil, principalmente as cultivadas com soja, tornando-se, junto com *Digitaria insularis* (capim-amargoso), uma das principais plantas daninhas desta cultura. Dentre as principais características dessas espécies, destacam-se à ampla adaptabilidade ecológica como grande produção de sementes (até 200 mil por planta), a dispersão das sementes que pode ultrapassar 100 metros de distância da planta mãe, ampla adaptabilidade aos sistemas conservacionistas de solo e a evolução de biótipos resistentes ao herbicida glifosato (WU; WALKER, 2004).

O glifosato é um herbicida inibidor da enzima enol-piruvil-shikimato-fosfato-sintetase (EPSPs), foi amplamente adotado como a principal forma de controle químico de plantas daninhas, principalmente da buva. Em função da flexibilidade desta molécula, acarretou o seu uso no manejo pré-semeadura da soja e em pós-emergência da cultura RR, o que ocasionou a seleção de biótipos de buva resistentes ao glifosato. A resistência é capacidade inerente e herdável de determinados biótipos, dentro de uma população, de sobreviver e se reproduzir após a exposição a doses de herbicidas que seriam letais a indivíduos suscetíveis da mesma espécie (CHRISTOFFOLETI et al., 2016).

Frente a esta situação, a buva passou a causar elevados prejuízos à soja, em função das falhas de controle ocasionadas pela ocorrência da resistência. Para *C. bonariensis*, quanto mais avançado o estágio de desenvolvimento no momento da semeadura da soja, maiores serão as perdas de rendimento, devido à dificuldade de manejo das mesmas (PATEL et al., 2010). Ainda, quanto mais avançado o estágio de desenvolvimento de *C. bonariensis*, menor é a eficiência do controle químico, sendo que o estágio ideal para realizar o manejo químico desta planta daninha é de até seis folhas (KASPARY, 2014). Assim, o manejo da buva exige a adoção de métodos alternativos de controle, sendo a utilização de herbicidas com mecanismos de ação alternativos ao glifosato uma das principais ferramentas.

De maneira geral, falhas de controle de plantas de buva no campo estão associadas ao estágio de desenvolvimento avançado no momento da aplicação, bem como o emprego de herbicidas ineficientes (VANGESSEL et al., 2009). Quanto mais

avançado o estágio de desenvolvimento da planta daninha, maior será a capacidade de metabolização e degradação do herbicida, o que ocasiona brotações laterais e ausência de controle (MOREIRA et al., 2010; SINGH; SINGH, 2004). A translocação dos herbicidas para todas as partes da planta também é reduzida em estádios de desenvolvimento avançados e interfere na eficiência dos produtos (SHRESTHA; HEMBREE; VA, 2007).

Medidas de controle de populações com resistência necessitam ser adotadas e podem ser realizadas pela aplicação de herbicidas com mecanismo de ação distinto ao do glifosato. A associação de herbicidas e utilização de herbicidas com mecanismos de ação diferentes são medidas preconizadas para o manejo integrado de plantas daninhas resistentes (JOHNSON; GIBSON, 2006; SHANER, 2000). Muitos herbicidas empregados no manejo em pré-semeadura da soja são alternativas eficientes no controle de populações de buva resistente ao glifosato. Paraquate, 2,4-D, glufosinato de amônio, saflufenacil mostraram-se alternativas eficientes (BIANCHI; SCHNEIDER; ROCKENBACH, 2011; KASPARY, 2014).

A indicação de herbicidas alternativos bem como o estágio de desenvolvimento adequado para o controle de buva resistente ao glifosato é importante para a implementação de práticas de manejo integrado desta planta daninha. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi identificar as alternativas químicas para o controle de buva resistente ao glifosato, aplicadas em diferentes estaturas da planta daninha.

4.4 Material e Métodos

Para atingir os objetivos propostos, foram conduzidos dois experimentos a campo, localizado na área experimental da Universidade de Cruz Alta – Cruz Alta, RS, nos anos de 2016 e 2017. No período de novembro a dezembro de 2016, realizou-se o primeiro ano do experimento. O segundo ano do experimento foi realizado no período de outubro a novembro de 2017.

Nos dois experimentos as condições experimentais foram as mesmas. O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizado, com quatro repetições, dispostos em esquema de parcelas subdivididas, sendo que cada unidade experimental

ocupou a área de 12m² (3m x 4). Na parcela alocaram-se os tratamentos herbicidas com diferentes mecanismos de ação, aplicados de forma isolada ou em associação com glifosato (Tabela 2), e na subparcela os diferentes estatura das plantas de buva: Estatura I plantas com no máximo 5 cm; Estatura II plantas entre 6 e 15 cm; e Estatura III plantas entre 16 e 25 cm.

Tabela 2. Tratamentos herbicidas, com seus respectivos mecanismos de ação, ingrediente ativo e dose. Cruz Alta - 2016 e 2017

Trat	Mecanismo de ação		Ingrediente Ativo		Dose (g i.a. ou e.a. ha ⁻¹)
1 ¹	Inib. da EPSPs	---	Glifosato	---	540
2	Inib. da EPSPs	---	Glifosato	---	1080
3	Inib. da EPSPs	---	Glifosato	---	2160
4	Inib. da EPSPs	---	Glifosato	---	3240
5	Inib. da EPSPs	Mimetizador de Auxinas	Glifosato	2,4-D	1080 + 1005
6	Inib. da EPSPs	Inib. da PROTOX	Glifosato	Saflufenacil	1080 + 49
7	Inib. do Fotossistema I	---	Paraquate	---	400
8	Inib. do Fotossistema I	---	Diquat	---	400
9	Inib. da Glutamina sintetase	---	Glufosinato de amônio	---	600
10	Testemunha	---	---	---	---

Fonte: Agrofít, 2018.

Nota: ¹Em todos os tratamentos foi adicionado o adjuvante Assist (0,5% v/v).

No experimento realizado no ano de 2016, os tratamentos foram aplicados no dia 25/11/2016, já no segundo experimento realizado em 2017, os tratamentos foram

aplicados no dia 20/10/2017. A aplicação dos herbicidas foi realizada com o auxílio de um pulverizador costal de precisão, pressurizado com CO₂, equipado com pontas tipo TT 110.015 distribuindo-se volume de calda equivalente a 100L ha⁻¹. As condições climáticas durante a aplicação nos experimentos estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Condições climáticas no momento da aplicação dos tratamentos nos dois anos de realização do experimento. Universidade de Cruz Alta, Cruz Alta, RS, Brasil, 2016 e 2017

Ano	Temperatura	Umidade relativa do ar	Velocidade do vento
1° (2016)	28 °C	35%	5 km/h
2° (2017)	20 °C	75%	6 km/h

Fonte: Dados do autor.

No momento da realização da primeira avaliação, foram determinadas as plantas com as respectivas estaturas, 10 plantas por parcela foram marcadas com palitos e posteriormente nas próximas avaliações o mesmo padrão de avaliação foi realizado sempre nas mesmas plantas com o intuito de obter a menor variabilidade possível. A variável avaliada foi controle aos 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT), utilizando escala percentual, onde zero representou ausência de sintomas e cem a morte das plantas (FRANS et al., 1986). Posteriormente os dados obtidos foram analisados quanto a normalidade e homocedasticidade, e posteriormente foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Em caso de significância estatística, compararam-se as médias pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4.5 Resultados e Discussão

O teste de Shapiro-Wilk demonstrou não ser necessária a transformação dos dados. Para os dois experimentos (2016 e 2017), os resultados evidenciaram haver diferenças de controle da população de buva a campo entre os herbicidas testados (Tabelas 4, 5, 6 e 7). Em ambos os experimentos a aplicação isolada do herbicida glifosato, nas quatro doses testadas, não foi possível obter controle satisfatório das

plantas de buva em nenhuma época de avaliação (Tabelas 4, 5, 6 e 7). No que se refere ao estágio de desenvolvimento, a aplicação isolada do glifosato foi estatisticamente igual nos três estágios de desenvolvimento, nas quatro épocas de avaliação.

Analisando os resultados do Experimento I realizado em 2016, foi possível obter controle satisfatório já aos 7 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT) nos tratamentos glifosato + saflufenacil, paraquate, diquat e glufosinato de amônio, quando aplicados em plantas com no máximo 5 cm (Tabela 4). Aos 14 DAT, plantas de buva no com até 5 cm permaneceram com o mesmo padrão de eficiência que aos 7 DAT entre os tratamentos. Já, na estatura entre 6 e 15 cm as plantas foram controladas com glifosato + saflufenacil e glufosinato de amônio (Tabela 4). A rápida velocidade de controle das plantas jovens deve-se principalmente ao modo de ação destes herbicidas, ambos possuem ação de contato e apresentarem rápido efeito de necrose no tecido foliar das plantas (SHANER, 2014).

Tabela 4. Controle (%) de *Conyza* spp. aos 7 e 14 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT), no experimento I (2016). Cruz Alta - 2017

Herbicidas (g e.a./i.a. ha ⁻¹)	Estatura		
	Até 5 cm	6 a 15 cm	16 a 25 cm
	7 DAT		
Glifosato (540)	A 6,2 e	A 6,2 e	A 6,2 e
Glifosato (1080)	A 11,7 d	A 9,7 e	A 9,7 e
Glifosato (2160)	A 11,0 d	A 8,0 e	A 8,0 e
Glifosato (3240)	A 11,7 d	A 9,0 e	A 8,0 e
Glifosato + 2,4-D (1080 + 1005)	A 38,7 c	B 20,0 d	B 20,0 d
Glifosato + Saflufenacil (1080 + 49)	A 100,0 a	B 87,5 a	C 82,0 a
Paraquat (400)	A 90,0 b	B 71,7 c	C 63,2 c
Diquat (400)	A 100,0 a	B 80,0 b	C 73,0 b
Glufosinato de Amônio (600)	A 98,2 a	B 85,0 a	C 80,0 a
Testemunha	A 0,0 f	A 0,0 f	A 0,0 f
C.V. (%)	8,45		
	14 DAT		
Glifosato (540)	A 6,0 c	A 3,2 e	A 2,7 d
Glifosato (1080)	A 12,5 c	A 7,0 e	A 5,5 d
Glifosato (2160)	A 9,0 c	A 4,7 e	A 4,0 d
Glifosato (3240)	A 10,0 c	A 6,7 e	A 5,0 d
Glifosato + 2,4-D (1080 + 1005)	A 73,7 b	B 47,5 d	B 40,0 c
Glifosato + Saflufenacil (1080 + 49)	A 100,0 a	A 97,5 b	B 82,5 a
Paraquat (400)	A 95,2 a	B 73,2 c	B 61,2 b
Diquat (400)	A 98,7 a	B 75,0 c	C 60,0 b
Glufosinato de Amônio (600)	B 99,0 a	A 100,0 a	C 72,0 a
Testemunha	A 0,0 c	A 0,0 e	A 0,0 d
C.V. (%)	23,5		

Fonte: Dados do autor.

Nota: Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna ou maiúscula na linha, comparadas em cada período de avaliação, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Na avaliação realizada aos 21 DAT, a aplicação de glifosato + 2,4-D incorporou-se ao grupo dos tratamentos que apresentaram eficiência em plantas com até 5 cm (Tabela 5). Na última avaliação realizada aos 28 DAT, a eficiência do tratamento glifosato + 2,4-D foi reduzida e permaneceram com eficiência os tratamentos glifosato + saflufenacil, paraquate, diquat e glufosinato de amônio, revelando que a aplicação de glifosato + 2,4-D necessita de complementação com aplicação sequencial de outro herbicida com ação de contato. Quando comparado à eficiência dos tratamentos em relação ao estágio de desenvolvimento das plantas de buva, somente os tratamentos glifosato + saflufenacil e glufosinato de amônio foram eficientes em plantas entre 6 e 15 cm de altura. Em plantas entre 16 e 25 cm de estatura, embora esses tratamentos tenham apresentado controle igual ou superior a 80%, vale ressaltar que as plantas não foram totalmente controladas e posteriormente rebrotaram, o que em situação de semeadura de soja neste período, estas plantas viriam a competir com a cultura em estágio de desenvolvimento avançado e sem alternativas de controle de pós-emergência da cultura. Produtos com ação de contato requerem maior cobertura da calda herbicida, fato este dificultado em plantas em estágio de desenvolvimento avançado. Desta forma, ocorre o rebrote lateral nas plantas, fazendo com que as mesmas tornem a sobreviver e competir futuramente com a cultura subsequente (MOREIRA et al., 2010).

Tabela 5. Controle (%) de *Conyza* spp. aos 21 e 28 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT), no experimento I (2016). Cruz Alta, RS - 2017

Herbicidas (g e.a./i.a. ha ⁻¹)	Estatura		
	Até 5 cm	6 a 15 cm	16 a 25 cm
	21 DAT		
Glifosato (540)	A 5,5 c	A 2,5 c	A 1,2 c
Glifosato (1080)	A 11,7 c	A 5,5 c	A 5,0 c
Glifosato (2160)	A 6,0 c	A 1,5 c	A 1,2 c
Glifosato (3240)	A 9,0 c	A 4,7 c	A 4,0 c
Glifosato + 2,4-D (1080 + 1005)	A 91,0 b	B 63,7 b	C 46,2 c
Glifosato + Saflufenacil (1080 + 49)	A 100,0 a	A 100,0 a	B 86,7 a
Paraquat (400)	A 98,0 a	B 68,2 b	C 53,2 b
Diquat (400)	A 92,5 b	B 66,2 b	C 50,0 b
Glufosinato de Amônio (600)	A 100,0 a	A 97,2 a	B 87,5 a
Testemunha	A 0,0 c	A 0,0 c	A 0,0 c
C.V. (%)	13,58		
	28 DAT		
Glifosato (540)	A 3,5 c	A 1,5 c	A 0,0 c
Glifosato (1080)	A 8,5 c	A 5,5 c	A 1,7 c
Glifosato (2160)	A 4,2 c	A 2,2 c	A 0,0 c
Glifosato (3240)	A 3,0 c	A 0,5 c	A 0,0 c
Glifosato + 2,4-D (1080 + 1005)	A 82,5 b	B 60,0 b	C 33,7 b
Glifosato + Saflufenacil (1080 + 49)	A 100,0 a	A 98,7 a	B 83,7 a
Paraquat (400)	A 100,0 a	B 56,2 b	C 36,5 b
Diquat (400)	A 100,0 a	B 55,0 b	C 38,7 b
Glufosinato de Amônio (600)	A 100,0 a	A 98,5 a	B 85,0 a
Testemunha	A 0,0 c	A 0,0 c	A 0,0 c
C.V. (%)	17,72		

Fonte: Dados do autor.

Nota: Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna ou maiúscula na linha, comparadas em cada período de avaliação, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Em relação aos resultados obtidos no Experimento I, deve-se observar alguns pontos tais como: o tratamento glifosato + 2,4-D embora aos 21 DAT apresentar mais de 90% de controle, aos 28 DAT o controle reduziu para 82%, ressaltando que somente esta aplicação necessita de complemento para levar as plantas de buva a morte. Os tratamentos com a aplicação isolada de herbicidas com ação de contato, em plantas com até 5 cm controlaram 100% das plantas de buva aos 28 DAT. No entanto, nos estádios superiores, os tratamentos reduziram sua eficiência nas duas últimas avaliações. Por este motivo, a aplicação destes herbicidas em plantas de buva em estágio de desenvolvimento superiores à 10 cm não deve ser recomendada devido ao elevado risco de rebrote das plantas, além da elevada pressão sobre o herbicida o que acelerará a seleção de populações resistentes.

No Experimento I, em 2016, no momento da aplicação dos tratamentos as condições climáticas não eram ideais para a aplicação de herbicidas. A temperatura encontrava-se em 28°C e a umidade relativa do ar em 35%. Aplicação de herbicidas com condições de umidade relativa inferior a 40% e temperatura superior a 27,5°C são consideradas como desfavorável (THEISEN; RUEDELL, 2004).

Os resultados obtidos no Experimento II realizado em 2017 apresentaram resultados semelhantes com os tratamentos com a aplicação isolada do herbicida glifosato. Embora as plantas de buva com até 5 cm apresentem leves sintomas, não houve diferença estatística entre as quatro doses testadas do glifosato e os três estádios de desenvolvimento nas quatro épocas de avaliação (Tabelas 6 e 7). Estes resultados sugerem que as populações de buva presentes na área de condução do experimento eram resistentes ao glifosato.

O tratamento com aplicação de glifosato + 2,4-D apresentou maior velocidade de controle no Experimento II em relação ao I para as três estaturas das plantas de buva. No entanto, a capacidade de recuperação das plantas de buva foi maior no Experimento realizado em 2017, isto devido principalmente a maior disponibilidade hídrica ocorrida neste ano. Assim mesmo, estes resultados confirmam a necessidade da complementação de controle a este tratamento como sugerido na apresentação dos resultados do Experimento I. A aplicação somente de glifosato + 2,4-D no momento da dessecação

resultou a presença de 13 plantas de buva m⁻² por ocasião da semeadura da soja, sendo as mesmas com média de 20 cm de estatura; já nos tratamentos onde houve a complementação com paraquate + diuron, as mesmas variáveis foram zeradas (OLIVEIRA NETO et al., 2010).

Tabela 6. Controle (%) de *Conyza* spp. aos 7 e 14 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT), no experimento II (2017). Cruz Alta - 2017

Herbicidas (g e.a./i.a. ha ⁻¹)	Estatura		
	Até 5 cm	6 a 15 cm	16 a 25 cm
	7 DAT		
Glifosato (540)	A 3,5 c	A 1,5 c	A 0,0 c
Glifosato (1080)	A 8,5 c	A 5,5 c	A 1,7 c
Glifosato (2160)	A 4,2 c	A 2,2 c	A 0,0 c
Glifosato (3240)	A 3,0 c	A 0,5 c	A 0,0 c
Glifosato + 2,4-D (1080 + 1005)	A 62,5 b	B 50,0 b	C 33,7 b
Glifosato + Saflufenacil (1080 + 49)	A 100,0 a	A 98,7 a	B 83,7 a
Paraquat (400)	A 100,0 a	B 56,2 b	C 36,5 b
Diquat (400)	A 100,0 a	B 55,0 b	C 38,7 b
Glufosinato de Amônio (600)	A 100,0 a	A 98,5 a	B 85,0 a
Testemunha	A 0,0 c	A 0,0 c	A 0,0 c
C.V. (%)	4,20		
	14 DAT		
Glifosato (540)	A 3,5 c	A 1,2 d	A 0,5 e
Glifosato (1080)	A 3,5 c	A 1,7 d	A 0,7 e
Glifosato (2160)	A 4,5 c	A 2,7 d	A 1,7 e
Glifosato (3240)	A 7,2 c	A 5,0 d	A 4,0 e
Glifosato + 2,4-D (1080 + 1005)	A 65,0 b	B 45,0 c	B 36,2 d
Glifosato + Saflufenacil (1080 + 49)	A 99,2 a	B 88,7 b	C 68,7 b
Paraquat (400)	A 99,7 a	B 86,2 b	C 52,5 c
Diquat (400)	A 100,0 a	A 98,7 a	A 90,7 a
Glufosinato de Amônio (600)	A 100,0 a	A 98,0 a	A 93,0 a
Testemunha	A 0,0 c	A 0,0 d	A 0,0 e
C.V. (%)	14,72		

Fonte: Dados do autor.

Nota: Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna ou maiúscula na linha, comparadas em cada período de avaliação, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Para os demais tratamentos, glifosato + saflufenacil, paraquat, diquat e glufosinato de amônio, já aos 7 DAT, as plantas com até 5 cm foram totalmente controladas. Este resultado manteve-se até 28 DAT quando foi realizada a última avaliação, com exceção para o tratamento glifosato + saflufenacil que aos 21 DAT iniciaram rebrotes em algumas plantas. Quando avaliou-se o desempenho dos tratamentos em função dos estádios de desenvolvimento, pode-se observar que os tratamentos que há diferenças entre os tratamentos na flexibilidade de controle em diferentes estádios de desenvolvimento. Para plantas de buva com estatura entre 6 e 15 cm, o tratamento que apresentou melhor resultado, considerando todo o período de avaliação foi glufosinato de amônio (Tabelas 6 e 7). O tratamento com glifosato + saflufenacil controlou 98,7% aos 7 DAT, no entanto na última avaliação finalizou com 77,5% de controle, devido a ocorrência de rebrote nas plantas de buva. O herbicida Diquat controlou lentamente as plantas de buva, porém foi consistente até aos 28 DAT. Aos 7 DAT, apresentou 55%, evoluindo para 98,7% aos 14 DAT e finalizando com 98,2 aos 28 DAT.

Tabela 7. Controle (%) de *Conyza* spp. aos 21 e 28 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT), no experimento II (2017). Cruz Alta - 2017

Herbicidas (g e.a./i.a. ha ⁻¹)	Estatura		
	Até 5 cm	6 a 15 cm	16 a 25 cm
	14 DAT		
Glifosato (540)	A 5,2 d	A 3,0 e	A 1,5 f
Glifosato (1080)	A 3,5 d	A 2,2 e	A 0,5 f
Glifosato (2160)	A 6,5 d	A 4,0 e	A 2,0 f
Glifosato (3240)	A 6,7 d	A 4,0 e	A 2,5 f
Glifosato + 2,4-D (1080 + 1005)	A 68,7 c	B 47,5 d	C 38,7 e
Glifosato + Saflufenacil (1080 + 49)	A 94,5 b	B 80,5 b	C 60,0 c
Paraquat (400)	A 97,5 a	B 72,5 c	C 45,0 d
Diquat (400)	A 100,0 a	A 99,5 a	B 85,5 b
Glufosinato de Amônio (600)	A 100,0 a	A 99,2 a	B 93,2 a
Testemunha	A 0,0 e	A 0,0 e	A 0,0 f
C.V. (%)	6,74		
	28 DAT		
Glifosato (540)	A 3,5 c	A 1,7 d	A 0,5 e
Glifosato (1080)	A 3,2 c	A 2,2 d	A 0,5 e
Glifosato (2160)	A 5,7 c	A 2,7 d	A 1,0 e
Glifosato (3240)	A 5,6 c	A 2,6 d	A 1,9 e
Glifosato + 2,4-D (1080 + 1005)	A 76,2 b	B 63,7 c	C 41,2 d
Glifosato + Saflufenacil (1080 + 49)	A 96,5 a	B 77,5 d	C 47,0 c
Paraquat (400)	A 98,7 a	B 66,2 c	C 40,0 d
Diquat (400)	A 100,0 a	A 98,2 a	B 82,5 b
Glufosinato de Amônio (600)	A 100,0 a	A 97,5 a	B 90,5 a
Testemunha	A 0,0 c	A 0,0 d	A 0,0 e
C.V. (%)	7,84		

Fonte: Dados do autor.

Nota: Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna ou maiúscula na linha, comparadas em cada período de avaliação, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Plantas de buva com estatura de 16 a 25 cm, somente glufosinato de amônio controlou acima de 90%, no entanto, limitou-se a 90,5% aos 28 DAT com início de rebrote nas plantas neste estágio de desenvolvimento. Desta forma, nenhum destes tratamentos pode ser utilizado de forma isolada no controle de plantas de buva com mais de 16 cm.

A maior eficiência de alguns tratamentos no Experimento II conduzido em 2017 pode ser principalmente devido às melhores condições climáticas ocorridas no momento da aplicação dos tratamentos. A temperatura encontrava-se em 20°C e a umidade relativa do ar em 75%. Estas condições são consideradas como ideais para a aplicação de herbicidas (THEISEN; RUEDELL, 2004).

Biótipos de *Conyza sumatrensis* resistente ao herbicida glifosato com até 7 cm de estatura foram controlados aos 14 DAT com a aplicação de glufosinato de amônio, paraquate + diuron e glifosato + glufosinato de amônio, aos 21 DAT incorporam-se ao grupo os tratamentos com 2,4-D e glifosato + 2,4-D (SANTOS et al., 2015). Plantas de buva em estágio de pré-florecimento somente foram controladas (acima de 90%) aos 28 DAT com a aplicação de glufosinato de amônio em associação com MSMA; bromacil + diuron e metsulfuron (MOREIRA et al., 2010).

O estágio de desenvolvimento está diretamente relacionado com a suscetibilidade à herbicidas, principalmente produtos de contato. Biótipos de *Conyza canadensis* apresentaram níveis de resistência ao glifosato diferentes em função do estágio de desenvolvimento (SHRESTHA; HEMBREE; VA, 2007). Desta maneira, a aplicação de herbicidas em buva em estádios iniciais de desenvolvimento é fundamental para a obtenção de sucesso no controle. Nas aplicações em estádios iniciais de desenvolvimento a suscetibilidade aos herbicidas é maior e resulta em menor risco de rebrote nas plantas. Em estádios avançados as plantas ao aumentarem o acúmulo de matéria seca, adquirem maior capacidade de sobrevivência e recuperação dos efeitos dos herbicidas (CARVALHO; OVEJERO; CHRISTOFFOLETI, 2008; MOREIRA et al., 2010).

Os tratamentos que proporcionaram entre 80 e 90% de controle não são suficientemente satisfatórios. Em função da ampla capacidade de produção de sementes de buva, em torno de 200.000 sementes por planta, somente o controle total das plantas impedirá a propagação de sementes da espécie para a própria área ou até mesmo para regiões distantes.

Vale ressaltar a importância da adoção de estratégias de manejo durante todo o ano nas áreas agrícolas. A utilização de culturas de cobertura no período do inverno aliado a aplicação de herbicidas, são alternativas que facilitam o controle na aplicação em pré-semeadura da soja. Essas estratégias auxiliam na redução na densidade e na estatura das plantas de buva no momento da dessecação (OLIVEIRA NETO et al., 2010). Com a utilização destas alternativas, há inúmeras alternativas de controle químico eficientes para serem utilizadas no momento da pré-semeadura da soja, principalmente nas plantas de buva em estágio de desenvolvimento inicial.

4.6 Conclusões

Plantas de buva com no máximo 5 cm são eficientemente controladas com os tratamentos herbicidas glifosato + saflufenacil, paraquate, diquat e glufosinato de amônio.

Plantas de buva entre 6 e 15 cm são eficientemente controladas com os tratamentos herbicidas glifosato + saflufenacil, diquat e glufosinato de amônio.

Plantas de buva entre 16 e 25 cm são controladas com a aplicação de Glufosinato de amônio.

5 CAPÍTULO III

Anatomia foliar de *Conyza sumatrensis* suscetível e resistente ao glifosato.

5.1 Resumo

Conyza sumatrensis é uma planta daninha de ocorrência em áreas agrícolas que apresenta resistência ao herbicida glifosato. A resistência pode estar envolvida com diferenças anatômicas entre biótipos resistentes e suscetíveis ao herbicida. O objetivo deste trabalho foi realizar a descrição anatômica da folha de biótipos de *Conyza sumatrensis* resistentes e suscetível ao herbicida glifosato, com vistas a identificar possíveis alterações que possam alterar a absorção e/ou a translocação do herbicida. Para tanto, foram coletadas folhas de dos biótipos resistentes e um suscetível ao glifosato e fixadas em FAA 70 e posteriormente fixadas em etanol 70. Foram utilizadas folhas mais desenvolvidas e realizadas as secções no terço médio da folha, manualmente com lâminas de barber. Foram realizadas a determinação da espessura da epiderme na face adaxial das folhas dos biótipos e o diâmetro dos feixes vasculares. As análises histológicas foram realizadas utilizando-se microscópio óptico, sendo tomadas fotografias de no mínimo quatro leituras em cada lâmina. Os resultados observados na caracterização da epiderme adaxial e do diâmetro dos feixes vasculares, não apresentaram diferenças entre os biótipos resistentes e suscetível. Desta forma, pode-se concluir que não há diferenças nas variáveis anatômicas espessura da epiderme e diâmetro dos feixes vasculares que possam relacionar com a resistência dos biótipos ao herbicida glifosato.

Palavras-chave: 1. Caracterização anatômica. 2. Buva. 3. Feixes vasculares. 4. Espessura da epiderme.

5.2 Abstract

Conyza sumatrensis is a weed of occurrence in agricultural areas that shows resistance to the herbicide glyphosate. Resistance may be involved with anatomical differences between biotypes resistant and susceptible to the herbicide. The objective of this work was to perform the anatomical description of the leaf of *Conyza sumatrensis* resistant and susceptible to the herbicide glyphosate, with a view to identify possible alterations that may alter the absorption and/or translocation of the herbicide. For this, leaves of the resistant biotypes and one susceptible to glyphosate were collected and fixed in FAA 70 and later fixed in ethanol 70. More developed leaves were used and sections were made in the middle third of the leaf, manually with barber blades. The determination of the thickness of the epidermis on the adaxial side of the leaves of the biotypes and the diameter of the vascular bundles were performed. The histological analyzes were performed using an optical microscope, and photographs of at least four readings were taken on each slide. The results observed in the characterization of the adaxial epidermis and the diameter of the bundles not showed differences between resistant and susceptible biotypes. In this way, it can be concluded that there are not differences in the atomic variables epidermal thickness and diameter of the vascular bundles that can be related to the resistance of the biotypes to the glyphosate herbicide.

Key-words: 1. Anatomic characterization. 2. Horseweed. 3. Vascular bundles. 4. Epidermal thickness.

5.3 Introdução

Conyza sumatrensis é uma planta daninha magnoliopsida herbácea, ocorrente em lavouras de soja no Brasil, e juntamente com *C. canadensis*, são consideradas as espécies mais distribuídas no mundo (THEBAUD; ABBOTT, 1995). Provavelmente, devido a características reprodutivas associadas ao potencial invasivo destas espécies, como elevada produção de sementes, rápida germinação e habilidade de dispersão das sementes (HAO et al., 2009). *C. sumatrensis* é originária da América do Sul, mas está dispersa em todos os continentes (PRUSKI; SANCHO, 2006).

C. sumatrensis está envolvida em 11 casos de resistência a herbicidas no mundo. Sendo estes relacionados aos herbicidas glifosato, chlorimuron, paraquat e diquat (HEAP, 2018). No Brasil, possui resistência simples ao glifosato, clorimurum e paraquate; e resistência múltipla a glifosato e clorimurum (HEAP, 2018). Ainda, no Brasil, já foram comprovadas a resistência ao glifosato em biótipos de *C. bonariensis* e *C. canadensis* (HEAP, 2018). Estas espécies foram selecionadas nas lavouras de soja Roundup Ready® (RR), devido ao uso repetido de glifosato, que resultou em elevada pressão de seleção. Fato este, que comprova a importância das buvas como uma das principais plantas daninhas em lavouras de soja no Brasil.

O glifosato inibe a enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetase (EPSPs) e impede a biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, necessários para a síntese de proteínas (DUKE; POWLES, 2008). A eficiência do glifosato é dependente de processos como retenção da molécula na superfície foliar, penetração foliar, translocação na planta até o sítio de ação e inibição da enzima alvo, onde o produto exercerá sua atividade herbicida (SATICHIVI et al., 2000). A absorção e translocação representam processos essenciais para a eficácia do herbicida (SATICHIVI et al., 2000). Desta forma, qualquer impedimento pode resultar em grandes prejuízos na eficiência de controle da espécie alvo.

O glifosato movimenta-se no floema seguindo a rota dos produtos da fotossíntese, das folhas fotossinteticamente ativas em direção às partes da planta em crescimento (HETHERINGTON et al., 1999). Assim, a absorção, translocação e metabolismo do herbicida podem afetar a sensibilidade da planta, pois este precisa atingir o sítio de ação numa concentração adequada (FERREIRA et al., 2006).

As plantas daninhas resistentes podem sobreviver à aplicação de herbicidas devido a diversos fatores, os quais podem estar relacionados ou não ao local de ação do herbicida. Quando não relacionado ao local de ação do herbicida, alterações anatômicas podem estar relacionadas com menor absorção e/ou translocação do herbicida, ocasionando em reduzida quantidade do herbicida no local de ação do herbicida.

A análise da espessura da epiderme e o diâmetro do sistema vascular entre biótipos suscetíveis e resistentes podem ser alternativas viáveis uma vez que sua

alteração pode alterar a quantidade do herbicida absorvido e/ou translocado e reduzir a sua ação herbicida. Considerando os aspectos mencionados, a realização da descrição anatômica das folhas de biótipos de *Conyza sumatrensis* resistentes e suscetíveis ao glifosato se justifica, a fim de verificar se essa possível alteração morfológica possui efeito na absorção e/ou translocação e, conseqüentemente, na sensibilidade ao herbicida.

Em biótipos de *C. bonariensis* e *C. canadensis* resistentes ao glifosato, não foi constatada diferença na absorção do herbicida, no entanto, nos biótipos resistentes a translocação revelou-se diferenciada em relação ao biótipo suscetível, confirmando a translocação como mecanismo associado a resistência destes biótipos ao herbicida glifosato (KÖGER; REDDY, 2005; CARDINALI et al., 2015).

Frente ao exposto, objetivou-se com este trabalho realizar a descrição anatômica da folha de biótipos de *Conyza sumatrensis* resistentes e suscetível ao herbicida glifosato, com vistas a identificar possíveis alterações que possam alterar a absorção e/ou translocação do herbicida.

5.4 Material e Métodos

Para a realização do experimento, foram utilizados dois biótipos de *Conyza sumatrensis* resistente ao herbicida glifosato e outra suscetível ao mesmo herbicida, previamente identificada em trabalho publicado na literatura (Tabela 8) (SANTOS et al., 2014). No mês de abril de 2016 os biótipos foram semeados em casa de vegetação na Universidade de Passo Fundo, no município de Passo Fundo-RS em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Em cada repetição, foram tomadas 10 visualizações. As análises anatômicas foram realizadas no Laboratório Multidisciplinar Vegetal, no período de janeiro a fevereiro de 2017, na Universidade de Passo Fundo.

Tabela 8. Identificação do município e coordenadas do local de coleta dos biótipos *Conyza sumatrensis* e a resposta desses biótipos à aplicação do herbicida glifosato, avaliados no primeiro experimento realizado em 2016 (capítulo 1). Passo Fundo - 2017

Código	Município	Coordenadas	Glifosato
COQ 02	Coqueiros do Sul-RS	Lat: 28°11'45" Long: 52°34'12"	R
PON 01	Pontão-RS	Lat: 28°01'30" Long: 52°46'22"	R
PON 03	Pontão-RS	Lat: 28°00'20" Long: 52°45'12"	S

Fonte: Dados do autor.

Nota: S= suscetível, R= resistente

Quando as plantas atingiram o estágio de 4 a 6 folhas, as folhas foram coletadas e imediatamente fixadas em FAA 70 (Formol-Ácido Acético-Álcool, 5:5:90 v/v), onde permaneceram por 48 horas. Após a fixação, o material foi estocado imerso em etanol 70 °GL até a montagem das lâminas. Foram utilizadas as folhas mais desenvolvidas dos biótipos, e as secções realizadas no terço médio da folha, no sentido transversal. As secções histológicas foram feitas manualmente, com lâminas de inox.

As secções selecionadas foram clarificadas em hipoclorito de sódio na concentração de 20%, para que o material perdesse toda coloração natural. Posteriormente, o material foi lavado em água acidulada e destilada. A coloração das secções foi feita com os corantes fucsina básica e azul de Alcian. Após a coloração, as lamínas foram montadas em glicerina 50% como meio de montagem. Para a vedação entre lâmina e lamínula, utilizou-se esmalte de unha incolor.

Foram realizadas a determinação da espessura da epiderme na face adaxial das folhas dos biótipos e o diâmetro dos feixes vasculares principais nos biótipos resistentes e suscetível ao herbicida glifosato.

As análises histológicas foram realizadas utilizando-se microscópio óptico (Olympus® modelo CX31), e a documentação fotográfica feita com câmera AxioCam

ERc5s – ZEISS, e foram tomadas no mínimo quatro leituras em cada lâmina. As fotos foram analisadas e descritas de acordo com a nomenclatura histológica atual.

Para a realização da análise estatística, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e em caso de significância estatística a comparação de médias utilizou-se o teste Tukey a 5% de probabilidade.

5.5 Resultados e Discussão

Os resultados observados na caracterização da epiderme adaxial e do diâmetro dos feixes vasculares de biótipos de *Conyza sumatrensis* resistentes e suscetível ao glifosato, não apresentaram diferenças entre si. Fato este confirmado pela ausência de significância estatística entre os biótipos. Os valores de espessura da epiderme adaxial foram de 13,05, 16,23 e 15,25 μm , para os biótipos COQ 02, PON 01 e PON 03, respectivamente. Já para a variável diâmetro dos feixes vasculares, as medições foram de 5582,08, 6115,29, e 5106,43 μm^2 , para os biótipos COQ 02, PON 01 e PON 03, respectivamente (Tabela 9; Figura 2 e 3).

Tabela 9. Espessura da epiderme na face adaxial e diâmetro dos feixes vasculares de biótipos de *Conyza sumatrensis*, resistente e suscetível ao herbicida glifosato. Passo Fundo - 2017

Biótipo	Espessura da epiderme (μm)	Diâmetro dos feixes vasculares (μm^2)
COQ 02	13,05 ^{ns}	5582,08 ^{ns}
PON 01	16,23	6115,29
PON 03	15,25	5106,43
Média	14,84	5601,26
C.V. (%)	4,49	36,17

Fonte: Dados do autor.

Nota: ^{ns} não significativo pelo teste F da análise de variância a 5% de probabilidade.

Embora a maioria dos trabalhos que abordam a relação entre anatomia foliar e resistência a herbicidas priorizem a avaliação de densidade estomática e tricomática, composição da cutícula, dentre outros, existe a necessidade também da determinação de outras variáveis que envolvem a epiderme e os feixes vasculares. Desta forma, a epiderme caracteriza-se por ser o tecido mais externo dos órgãos vegetais, tendo como principal função o revestimento dos demais tecidos, evitar a perda de água, além de proteger da ação de danos mecânicos e patógenos, sendo porta de entrada de agroquímicos para o interior da planta (APEZZATO DA GLORIA; CARMELO-GUERREIRO, 2004; KRAEHMER; BAUR, 2013).

Depois de iniciado o processo de absorção do herbicida, a primeira camada celular encontrada são as células da epiderme. Assim, a importância da espessura desta gama de células pode afetar o processo de absorção e translocação do glifosato. Fato este sugerido por diversos autores, que mencionam a translocação do glifosato como possível mecanismo de resistência em *Conyza* spp. (FENG et al., 2004; SAMMONS; GAINES, 2014).

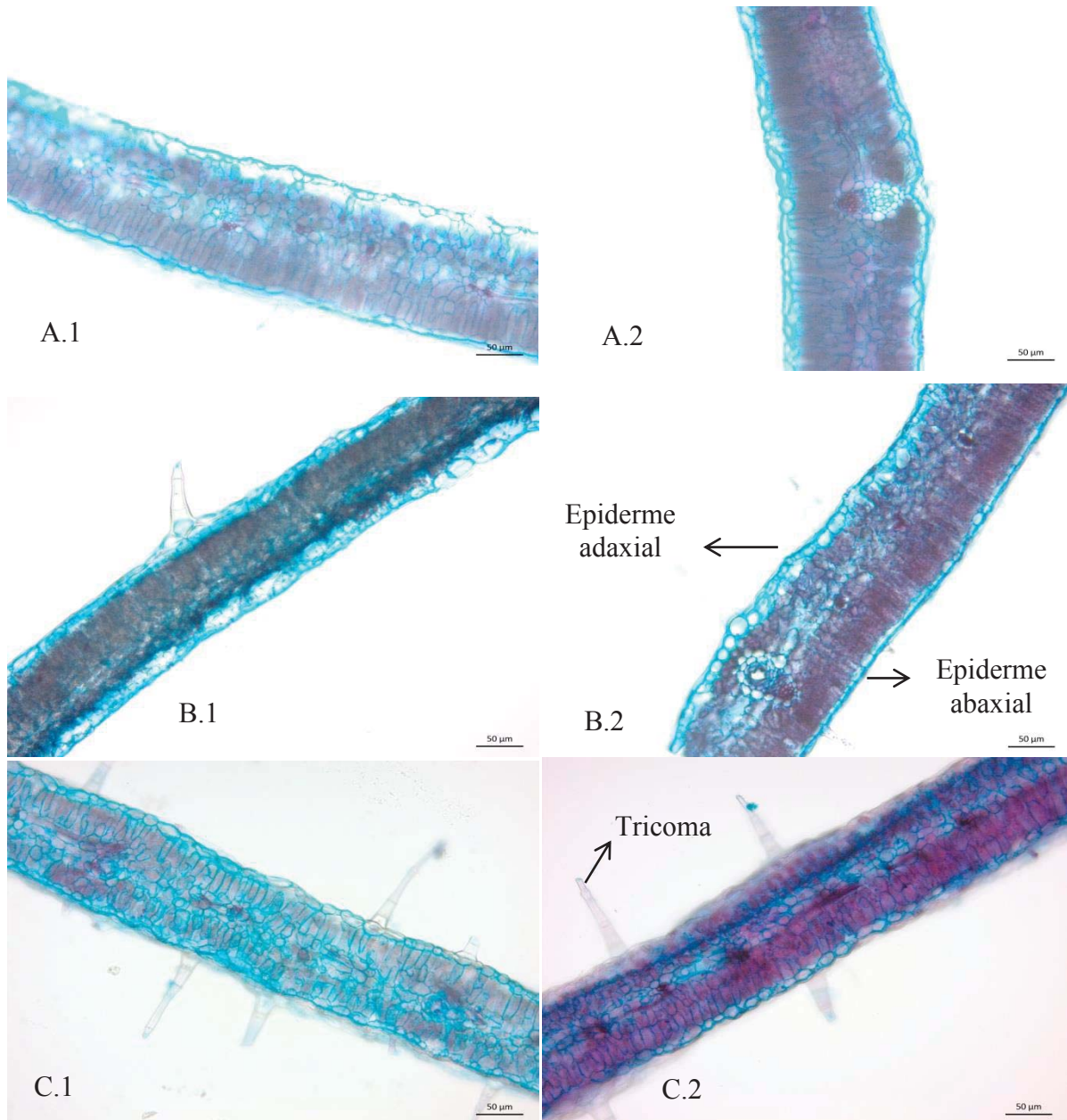
Quando ocorrida a absorção, pelas células da epiderme, quanto mais lento for o processo do herbicida chegar até outras células e, posteriormente aos feixes vasculares, processos de metabolização a outros compostos e até a ativação ou inativação podem estar ocorrendo nas células da epiderme (VELINI et al., 2009).

As células epidérmicas caracterizam-se por estarem perfeitamente justapostas, sem deixar espaços intercelulares. Esta característica é de grande importância, devido à função da epiderme de perder água e ao mesmo tempo, a absorção do herbicida obrigatoriamente necessita atravessar a epiderme (APEZZATO DA GLORIA; CARMELO-GUERREIRO, 2004).

Desta forma, este trabalho apresenta a primeira investigação da espessura da epiderme em relação a biótipos de buva resistentes e suscetível ao glifosato. Portanto, não foi possível encontrar diferenças entre os biótipos, revelando que esta variável anatômica muito provavelmente não estar relacionada com a resistência dos biótipos. De maneira similar, biótipos de buva resistente e suscetível aos herbicidas glifosato e

clorimurom não apresentaram diferença na densidade estomática (SANTOS et al., 2014).

Figura 2. Secção transversal da folha de *Conyza sumatrensis* COQ 02 (A.1 e A.2), PON 01 (B.1 e B.2) e PON 03 (C.1 e C.2), em destaque a epiderme adaxial e abaxial. Passo Fundo - 2017

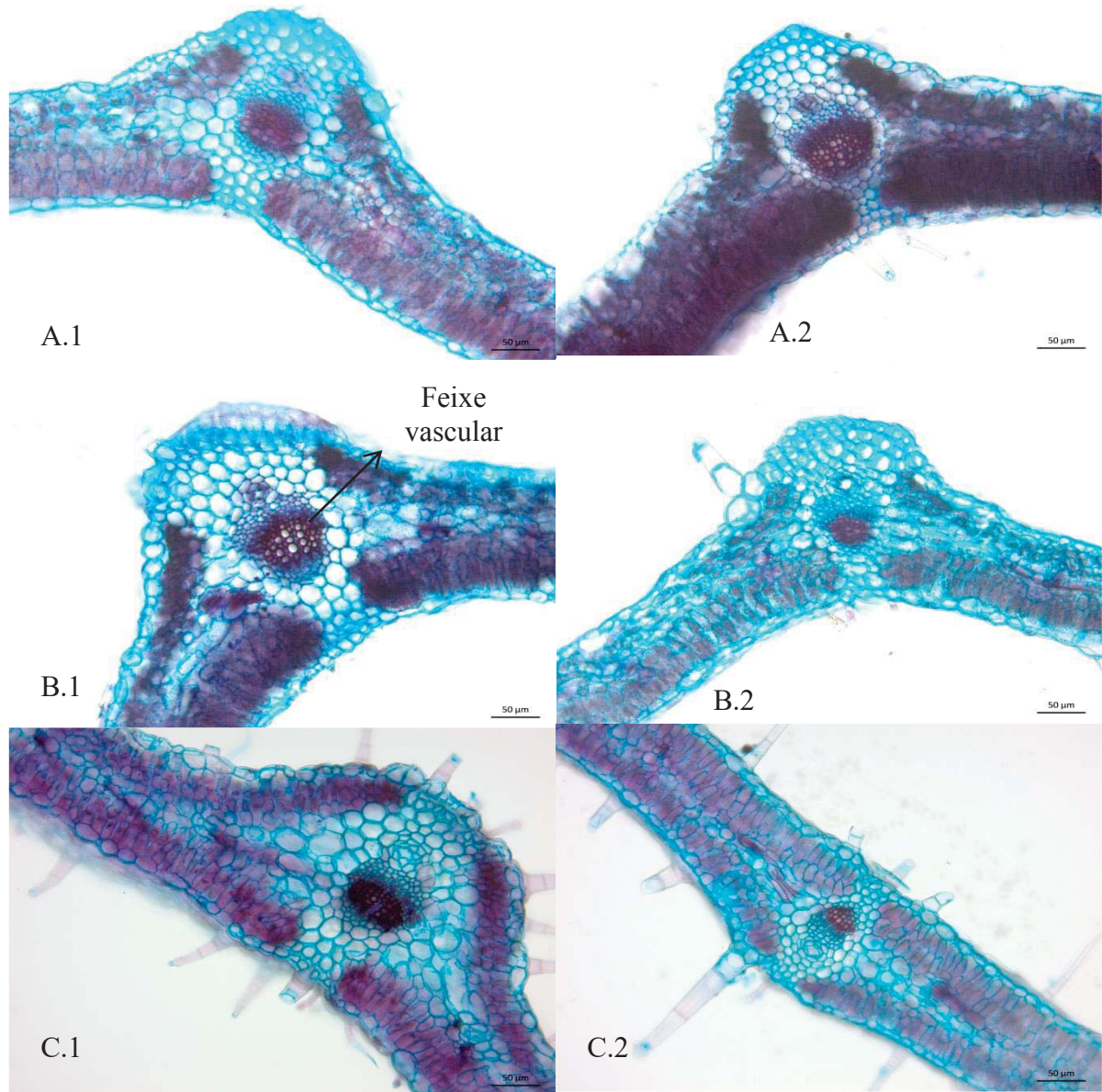


Fonte: Dados do autor.

Observa-se junto à epiderme, tricomas tectores, em forma de agulha (Figura 2). Os tricomas podem atuar como redutor da quantidade de herbicida que chega a epiderme para posteriormente ser absorvido, retendo gotículas da calda aspergida . Desta forma, a princípio os tricomas não atuam como agentes de absorção e translocação para as células epidérmicas.

Após atravessar a epiderme, o glifosato deve chegar aos feixes vasculares, que irão carregar o herbicida para diferentes partes da planta. A análise do diâmetro dos feixes vasculares revelou não haver diferenças entre os biótipos resistentes e suscetível (Tabela 9). O glifosato move-se no interior da planta seguindo a rota dos fotoassimilados pelo floema, o que permite inferir que quanto maior o diâmetro dos feixes vasculares, maior a translocação do herbicida na folha para as demais partes da planta (DUKE; POWLES, 2008). Para o melhor desempenho do glifosato, é necessário primeiramente excelente absorção e translocação até pontos de crescimento, pois a metabolização ou degradação e reduzida translocação, podem resultar em redução da eficácia do glifosato (DUKE; POWLES, 2008).

Figura 3. Secção transversal da folha de *Conyza sumatrensis* COQ 02 (A.1 e A.2), PON 01 (B.1 e B.2) e PON 03 (C.1 e C.2), em destaque os feixes vasculares. Passo Fundo - 2017



Fonte: Dados do autor.

A absorção e translocação do glifosato em buva são bastante estudadas, sendo que na maioria dos trabalhos não são encontradas diferenças na absorção do glifosato, já a translocação é diferencial entre biótipos resistentes e suscetíveis. Em *Conyza*

canadensis não foi observado diferença na taxa de absorção do glifosato entre os biótipos suscetível e resistente. Quando comparada a translocação do herbicida nos mesmos biótipos, observou-se que para dois biótipos resistentes, a translocação reduziu 28 e 48% em relação ao biótipo suscetível (KOGER; REDDY, 2005). A translocação diferencial também foi identificada em populações de *Lolium rigidum* e *L. multiflorum* resistentes ao glifosato (ADU-YEBOAH et al., 2014; GONZÁLES-TORRALVA et al., 2012).

Diversos trabalhos comprovam a translocação diferencial entre os biótipos resistentes e suscetíveis, no entanto, não se sabe certamente o motivo pelo qual ocorre menor translocação do glifosato nos biótipos resistentes. Em adição a estas informações, outros tantos trabalhos identificaram que ocorre o sequestro do glifosato no vacúolo celular, um local onde o herbicida não exercerá seu efeito nas plantas (GE et al., 2010). Em *C. canadensis*, foi identificado que há rápido sequestro do glifosato no vacúolo nos biótipos resistentes, confirmando este como um mecanismo de resistência desta espécie ao glifosato (GE et al., 2010; GE et al., 2014). Outra informação bastante relevante é que existe diferença na dinâmica do sequestro do glifosato no vacúolo em função da temperatura, sendo eu em condições de temperatura em torno de 20°C, o sequestro do herbicida é mais acentuado (GE et al., 2011). Outro mecanismo de resistência relatado para buva é a metabolização do glifosato mais rápida no biótipo resistente a compostos não fitotóxicos como glyoxilato, sarcosina e aminomethylphosphonico (GONZÁLES-TORRALVA et al., 2012).

Assim, de acordo com as observações anatômicas realizadas, não há diferenças que possam levar a indícios da razão pelo qual os biótipos resistentes possuem esta característica. Desta forma, torna-se evidente a necessidade da realização de trabalhos envolvendo as áreas de fisiologia, biologia e genética molecular, uma vez que a grande maioria dos trabalhos que envolvem buva resistente ao glifosato revelam haver processos fisiológicos e moleculares relacionados com a resistência.

5.6 Conclusões

Não há diferenças nas variáveis anatômicas, espessura da epiderme e diâmetro dos feixes vasculares entre os biótipos resistentes ao glifosato COQ 02 e PON 01 e o biótipo suscetível PON 03, que possam estar relacionadas com a resistência ao herbicida glifosato.

6 CAPÍTULO IV

Similaridade genética entre biótipos de *Conyza sumatrensis* revelada por marcadores moleculares microssatélite

6.1 Resumo

Diante do cenário da rápida evolução das populações de *Conyza sumatrensis* resistente ao herbicida glifosato, faz-se necessário conhecer a diversidade genética nestas populações, visando o auxílio na elaboração de estratégias de manejo dessa planta daninha. Frente ao exposto, o objetivo do presente estudo foi analisar a similaridade genética em biótipos de *Conyza sumatrensis*, oriundos de diferentes regiões do Brasil, analisando o polimorfismo de locos microssatélites. Foram selecionados 15 biótipos de diferentes regiões geográficas, sendo 14 resistentes e um suscetível ao glifosato. Os biótipos foram semeados e posteriormente coletou-se material vegetal para extração de DNA. Utilizou-se 19 marcadores moleculares microssatélites *Simple Sequence Repeats* (SSR) desenvolvidos para o gênero *Conyza*. Realizou-se a amplificação em termociclador e posteriormente as amplificações foram visualizadas em gel de agarose por meio de fotodocumentador digital. A similaridade genética foi estimada pelo coeficiente de Jaccard os biótipos agrupados pelo método UPGMA. Os resultados evidenciaram elevada diversidade do material analisado, formado dois grupos, onde em um grupo incorporou-se somente o biótipo suscetível, e o outro os demais biótipos estudados, todos resistentes. A elevada variabilidade genética indica que há chances elevadas de os biótipos apresentarem diferentes respostas frente ao manejo empregado. Desta forma, pode-se concluir que há ampla variabilidade genética entre as populações de *C. sumatrensis* estudadas, e que possivelmente mecanismos de resistência existentes para o herbicida glifosato, possam estar influenciando a elevada variabilidade genética.

Palavras-chave: 1. Polimorfismo. 2. SSR. 3. Buva. 4. Variabilidade genética.

6.2 Abstract

Considering the scenario of the rapid evolution of the populations of *Conyza sumatrensis* resistant to the herbicide glyphosate, it is necessary to know the genetic diversity in these populations, aiming the aid in the elaboration of management strategies of this weed. In view of the above, the objective of the present study was to analyze the genetic similarity in *Conyza sumatrensis* biotypes from different regions of Brazil, analyzing polymorphism of microsatellite loci. We selected 15 biotypes from different geographic regions, being 14 resistant and one susceptible to glyphosate. The biotypes were seeded and later plant material was collected for DNA extraction. It was used 19 microsatellite markers Simple Sequence Repeats (SSR) developed for the genus *Conyza*. Amplification was performed in thermocycler and the amplifications were then visualized on agarose gel by means of digital photodocumentator. The genetic similarity was estimated by the Jaccard coefficient the biotypes grouped by the UPGMA method. The results evidenced a high diversity of the analyzed material, formed two groups, where in one group only the susceptible biotype was incorporated, and the other the other biotypes studied, all resistant. The high genetic variability indicates that there are high chances of the biotypes presenting different responses to the management used. Thus, it can be concluded that there is a wide genetic variability between the populations of *C. sumatrensis* studied, and that possibly existing resistance mechanisms for the glyphosate herbicide may be influencing the high genetic variability.

Key-words: 1. Polymorphism. 2. SSR. 3. Horseweed. 4. Genetic Variability

6.3 Introdução

As plantas daninhas regularmente se adaptam às mais variadas pressões de seleção a que são impostas, incluindo clima, solo, práticas de manejo e distúrbios ocasionados pelo homem (BEGG et al., 2012; POWLES; YU, 2010). A capacidade de adaptação rápida impõe a produtores e pesquisadores constantes desafios frente à capacidade de redução e/ou depreciação da produção agrícola no mundo. O maior

exemplo de adaptação dessas plantas a práticas de manejo é a evolução da resistência aos herbicidas (JASIENIUK; BRULÉ-BABEL; MORRISON, 1996; POWLES; YU, 2010). A resistência de plantas daninhas aos herbicidas envolve inúmeras espécies e herbicidas, principalmente ao glifosato. Atualmente, há 293 casos de resistência ao glifosato, perfazendo 41 espécies de plantas daninhas em todo o mundo (HEAP, 2018).

O glifosato apresenta inúmeras características favoráveis ao seu uso, como baixa toxicidade a mamíferos, nenhuma atividade no solo e efetividade em amplo espectro de espécies, tornando-o indispensável no manejo de plantas daninhas. (DUKE; POWLES, 2008; SAMMONS; GAINES, 2014). O seu uso aumentou linearmente nas últimas décadas, principalmente em sistemas de semeadura direta, bem como pela introdução de culturas geneticamente modificadas com a tecnologia Roundup Ready® (RR) (BENBROOK, 2016; DUKE; POWLES, 2008; OWEN, 2008).

Das inúmeras espécies pertencentes ao gênero *Conyza*, algumas delas são importantes plantas daninhas causadoras de perdas econômicas na agricultura (BOSSDORF et al., 2005). Dentre elas, destaca-se a espécie *C. sumatrensis* (popularmente chamada de buva), sendo esta nativa da América do Sul e que se espalhou para regiões mais quentes de todos continentes, apresenta ciclo anual ou bianual, se reproduz somente via semente e principalmente autopolinização (CASE; CRAWLEY, 2000; HAO et al., 2009; THEBAUD et al., 1996).

A ocorrência de populações de *C. sumatrensis* resistente ao glifosato em diversas regiões do Brasil leva a suposição da ocorrência de elevada similaridade genética entre essas populações, uma vez que o principal método de dispersão de sementes de buva é através do vento, além da contaminação de maquinários e lotes de sementes. Em *C. sumatrensis* a resistência ao glifosato foi relatada em quatro países, e no Brasil esta espécie foi identificada com resistência simples ao glifosato em 2010 (HEAP, 2018).

Embora a maior parte das populações de *Conyza* spp. apresentar resistência ao glifosato, ainda existem biótipos suscetíveis a este herbicida (capítulo 1). Desta forma, e de acordo com os preceitos básicos da genética de populações, a existência de variabilidade genética em indivíduos dentro de uma população aumenta a chance de

alguns indivíduos responder diferentemente frente a alterações no meio ambiente e, como consequência, garantir a preservação da espécie (ALLEN DORF; LUIKART, 2007). As populações de plantas daninhas com maior diversidade genética podem se constituir em obstáculo para o controle, porque as plantas apresentam respostas variáveis a herbicidas e/ou concentrações diferentes de herbicidas. Ainda, a ocorrência de um evento desfavorável pode eliminar todos os indivíduos suscetíveis e permitir a sobrevivência dos resistentes (KISSMANN, 2003).

Para estudar esta variabilidade genética entre populações de plantas daninhas, emprega-se o uso de marcadores moleculares, por revelarem essa variabilidade, em nível genômico, de forma rápida, simples e eficaz (FERREIRA; GATTAPAGLIA, 1995). Os marcadores moleculares microssatélites, também denominados *Simple Sequence Repeats* (SSR), são marcadores moleculares que consistem em sequências de um a seis pares de bases que se repetem em *tandem*. Estas regiões ocorrem frequentemente nos genomas das plantas e exibem grande variação, sendo considerados como os marcadores moleculares mais informativos para estudos de genética em nível de espécies (GOLDSTEIN; SCHLOTTERER, 1998). Tais marcadores também permitem a discriminação genética de indivíduos proximamente relacionados, bem como a distinção entre populações (VARSHNEY; GRANER; SORRELLS, 2005).

Pesquisas com o gênero *Conyza* foram realizadas com o objetivo de obter informações sobre a evolução, origem e dispersão da resistência das espécies ao herbicida glifosato (MAROCHIO et al., 2017; OKADA et al., 2013; OKADA et al., 2014; REN; LI; DING, 2010). Nesses estudos, a análise dos marcadores microssatélites se dá pelo fato de que a presença de múltiplos alelos por *locus* favorece a avaliação da diversidade genética entre populações e subpopulações, como é o caso da maioria das plantas daninhas (ZHANG et al., 2009), contribuindo assim para estudos de manejo dessas plantas.

Frente ao exposto, o objetivo do presente estudo foi analisar a similaridade genética, em biótipos de *C. sumatrensis*, oriundos de diferentes regiões do Brasil, analisando o polimorfismo de locos microssatélites.

6.4 Material e Métodos

6.4.1 Material Vegetal

Os biótipos utilizados neste estudo (Tabela 10) são oriundos do primeiro capítulo. As sementes foram coletadas nos seus respectivos municípios, em áreas com histórico de aplicações de glifosato na dessecação das plantas daninhas e de cultivo de soja *Roundup Ready* (RR), com observações dos produtores em relação à falta de controle das mesmas após o uso de glifosato. Desta forma, foram selecionados 15 biótipos da espécie *C. sumatrensis*, sendo 14 resistentes e um suscetível ao herbicida glifosato (Figura 4). Cada planta foi colocada individualmente em saco de papel para não acontecer a mistura das sementes dos diferentes locais de coleta.

Tabela 10. Biótipos de *Conyza sumatrensis* utilizados no estudo de similaridade genética e seus respectivos municípios de coleta e resposta ao glifosato. Passo Fundo - 2017

	Biótipo	Município	Estado	Resposta ao glifosato ¹
19	DIO 01	Diamante do Oeste	PR	R
30	MIS 01	Missal	PR	R
42	ITA 01	Itaporã	MS	R
56	BOM 05	Bonito	MS	R
57	MAR 02	Maracaju	MS	R
86	POP 06	Ponta Porã	MS	R
107	IND 01	Indápolis	MS	R
147	TUP 02	Tupanciretã	RS	R
154	SAB 01	Santa Bárbara do Sul	RS	R
164	JAR 04	Jari	RS	R
168	CAR 01	Carazinho	RS	R
171	QUEV 04	Quevedos	RS	R
173	JUC 05	Júlio de Castilhos	RS	R
178	BAG 04	Bagé	RS	R

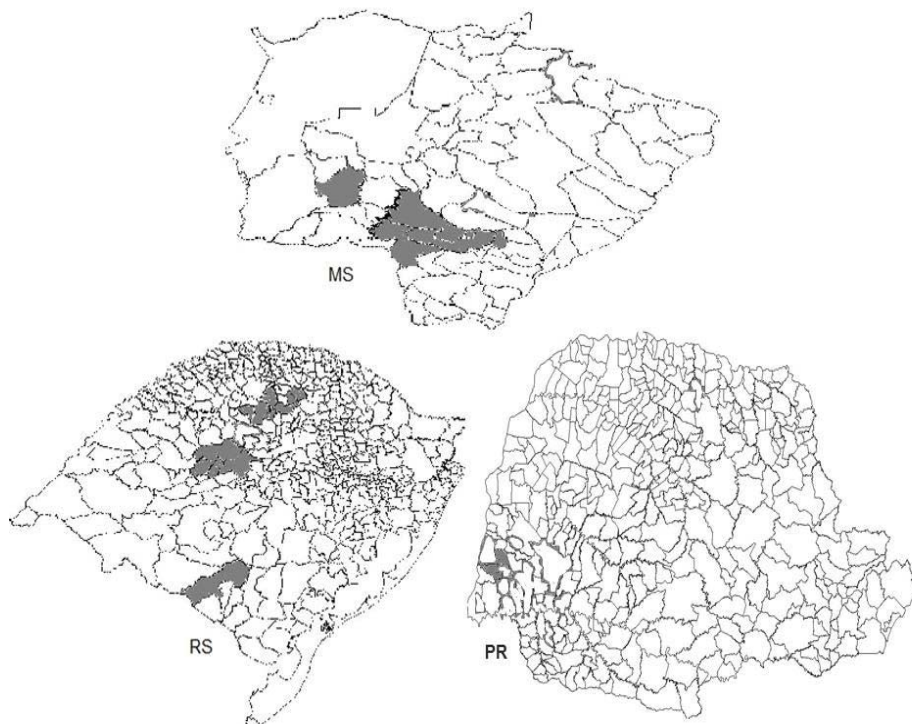
Fonte: Dados do autor.

Nota: ¹R= resistente; S=suscetível

A semeadura das sementes foi realizada no mês de Abril de 2016, em casa de vegetação da Universidade de Passo Fundo - UPF, no município de Passo Fundo, no Estado do Rio Grande do Sul, sendo semeadas em vasos com capacidade volumétrica de 500 mL, com posicionamento superficial de aproximadamente 0,5 cm. As sementes foram irrigadas diariamente, e quando ocorreu à emergência das plântulas, as mesmas foram transferidas para outros vasos com as mesmas características dos anteriores e mantidas até o momento de coleta de folhas para extração de DNA.

Como confirmação da resistência, em experimento paralelo foi aplicado o herbicida glifosato na dose de 1440 g e.a. ha⁻¹, quando as plantas atingiram o estágio de 4 a 6 folhas verdadeiras, sendo classificadas de acordo com a resposta ao herbicida.

Figura 4. Localização geográfica dos biótipos nos seus respectivos municípios nos Estados do Mato Grosso do Sul (MS), Rio Grande do Sul (RS) e Paraná (PR). Adaptado de Mapas para colorir, 2017



Fonte: Dados do autor.

6.4.2 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo, localizado em Passo Fundo, Rio Grande do Sul, conforme a metodologia descrita por DOYLE & DOYLE (1990). A coleta do material de *C. sumatrensis* ocorreu no mês de Setembro de 2016. O DNA foi extraído de folhas jovens, sendo que as folhas foram coletadas e acondicionadas em papel alumínio, devidamente identificadas, e acondicionadas em caixa de isopor com nitrogênio líquido e transportadas para o

laboratório. Foram extraídos o DNA do total de 120 plantas, sendo os 15 biótipos com 8 repetições de cada biótipo.

Para extração de DNA, 300 mg de tecido foliar foram maceradas em nitrogênio líquido e acondicionadas em microtubos de 2 mL, devidamente identificados. Em cada microtubo foram adicionados 1 mL de tampão de extração. Os microtubos foram agitados em *vortex* e incubados a temperatura de 65 °C em banho-maria por 60 minutos, invertendo gentilmente os microtubos a cada 10 minutos. Posteriormente, os microtubos foram retirados do banho-maria e resfriados a temperatura ambiente por 5 minutos. Após este procedimento, adicionou-se 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico preparado na proporção de 24;1, e agitados suavemente durante 10 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos com 5.000 r.p.m. e a fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para novos microtubos devidamente identificados. A este sobrenadante foi adicionado 500 µL de isopropanol gelado e incubados em -20 °C durante 2 horas. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 r.p.m. e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi, primeiramente, lavado com etanol 70% e 95% e posteriormente ao descarte dessas soluções, foi deixado à temperatura ambiente para completa secagem.

Após a secagem, o precipitado foi ressuspenso em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0) e agitado suavemente para completa solubilização do DNA. Por último, visando digerir o RNA presente nas amostras, adicionou-se 0,3 µL de RNase (10 mg/mL) nas amostras que permaneceram por 30 minutos a 37 °C e, posteriormente foram acondicionadas em ultrafreezer a -80 °C para sua manutenção e posterior uso.

6.4.3 Quantificação dos DNAs extraídos de *C. sumatrensis*

Para quantificar e verificar a integridade do DNA extraído, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose em concentração de 0,8%, preparado com tampão TBE em concentração 1x, pH 8, sob voltagem de 80 V. As amostras foram comparadas com marcador fago λ de 50 e 100 ng. Para visualização, o gel foi corado

com Brometo de Etídio em concentração 0,5 µg/mL. Em seguida, o gel foi fotografado sob luz UV, usando fotodocumentador digital GelDoc XR+ (Bio-Rad). As amostras também foram quantificadas em espectrofotômetro UV-visível modelo Nanodrop, para verificar a concentração de DNA por µL de cada amostra para a diluição a serem utilizadas nas reações de PCR.

6.4.4 Marcadores moleculares e variabilidade genética

Para a análise da similaridade genética, foram selecionados da literatura, 19 marcadores moleculares microssatélites (SSR) desenvolvidos para o gênero *Conyza*, visando obter o maior número possível de marcas no genoma de *C. sumatrensis* (Tabela 11). Os marcadores SRR IUB-1, IUB-2, IUB-3, IUB-4, IUB-5, IUB-6, IUB-8 e HNCA-2 (WHITTON et al., 1997), foram utilizados, no entanto, não foi obtido sucesso na amplificação destes *primers*. As amplificações da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR (Polymerase Chain Reaction) foram realizadas isoladamente para cada marcador em 10 µL de solução contendo 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador ou primer (F=*forward* e R=*reverse*), 0,2 mM de dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 0,75 U de Taq DNA polimerase, tampão 1X e 100 ng de DNA de cada biótipo em estudo.

Tabela 11. Relação de *primers* microssatélites, sequência de nucleotídeos (F=*forward* e R=*reverse*) e concentrações usadas na reação de amplificação de amostras de DNA de *Conyza sumatrensis*. Passo Fundo - 2017

<i>Primers</i>	Sequência de nucleotídeos	Volume por 10 µL de reação
HW02 ¹	F: AGTATTTGGCAATCAAATTCG R: TCACAATCACAAACAACACAAA	0,18 µL
HW04 ¹	F: GCCACCCTATTGTTTTGGTTAT R: AACTTGCATGGTAGTCAACGTC	0,18 µL
HW06 ¹	F: CTTGCATGGTAGTCAACGTCAT R: CAGAGGTGGTCATGTGATGTG	0,18 µL
HW07 ¹	F: GTGTGGCGCTACTCATTTC	0,38 µL

	R: TGATCACACCTGCGATTTGT	
HW14 ¹	F: AAATAAGGGTGATTGGGGAAT R: TGGTAGCCAAAAAGCTACAAA	0,25 µL
HW21 ¹	F: ATAGTCGAATTGGTCACGATTTG R: GCAGTTTTCACTCTTCTCTCGAA	0,18 µL
HW27 ¹	F: TTTCATAGTCGAATTGGTCACG R: CCGGTAGCAGTTTTCACTCTTC	0,20 µL
HW29 ¹	F: CTAATTGTTCAATTTATCCATAC R: AAATAAGTTACTTCTCTTCC	0,38 µL
HWSSR01 ²	F: TATGTTGTACGACTGACTGAGTC R: CCATTGACTGTAGACCAGTGTG	0,25 µL
HWSSR03 ²	F: TTGACTCCAACCTCGTAGTGTATG R: ACGTTAAATCTCTCGTGTCTTC	0,20 µL
HWSSR04 ²	F: GGAAAACCTCCTGTCATAGTATTAGC R: ATTAAAATCTAGCAAGGCCGAAC	0,20 µL
HWSSR09 ²	F: CATGAGTTTGAGTTATCCCAGAT R: CGAATACTTTCAATGCTTACGAC	0,18 µL
HWSSR11 ²	F: ATCGTTGACATCTGACTCTGC R: GATTCTTGCTCTGGTTCCTTG	0,20 µL
HWSSR12 ²	F: CATAACAAACGGATTAGTGGCG R: ATTATTGACGACCAACAACACC	0,25 µL
IUB 7 ³	F: TATAAACTGCCCCTTCTCTCC R: GAGGTTGAAGCATGCAGTTC	0,35 µL
OSU 1 ³	F: ACAAGTCGGCTGGTGAGC R: ACATGAAACACGAGCTAAACCA	0,18 µL
OSU 2 ³	F: CACTTCTCACACTTTGGGCA R: CCAAATAATTACCATCATGCCA	0,18 µL
OSU 4 ³	F: AGAACTGGCAGCTTGGAATA R: GTCCAAATGGTGGAAACTACC	0,18 µL
HNCA 1 ³	F: TTGGAGATGTGTTTGTGTTCTAGAG	0,18 µL

R: ACCTACACCTTAGTTAAACCTTGCC

Fonte: ¹Wang et al., 2008. ²Okada et al., 2015. ³Whitton, Rieseberg e Ungerer, 1997.

As reações da PCR foram conduzidas no termociclador GeneAmp Thermal Cycler 9700 (Applied Biosystems – ABI) utilizando-se a seguinte programação: um ciclo a 94 °C por 3 min; 5 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min (decrecendo 1 °C por ciclo até 55 °C), 72 °C por 1 min; 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min; e um ciclo de 72 °C por 10 min. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 2%, por aproximadamente duas horas a 110 volts, e visualizados em fotodocumentador digital GelDoc XR+ (Bio-Rad). O marcador ladder utilizado foi de 100pb.

A similaridade genética entre os biótipos foi estimada pelo coeficiente de Jaccard (1901). Os biótipos foram agrupados pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages), desenvolvido por Sokal e Michener (1958), sendo que os biótipos foram considerados como unidades taxonômicas operacionais (OTUs) e como caracteres binários as bandas obtidas pelos marcadores. O programa utilizado para a análise dos dados foi o GENES (CRUZ, 1998). O valor do conteúdo de polimorfismo informativo - PIC (Polymorphism Information Content) foi determinado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$PIC = 1 - \sum P_{ij}^2$$

Onde P_{ij}^2 é a frequência do alelo j th, abrangendo todos os alelos por locos (NEI, 1973).

6.5 Resultados e Discussão

A metodologia descrita por Doyle e Doyle (1990), empregando-se folhas como material biológico, utilizada no presente trabalho, se mostrou eficiente para produzir DNA de qualidade para a amplificação utilizando *primers* microssatélites, e os resultados destas amplificações foram reproduzíveis.

Para a análise da similaridade genética, foram utilizados 19 marcadores moleculares do tipo microssatélites dos quais 16 (84,2%) apresentaram polimorfismo (Tabela 4): HW02, HW04, HW06, HW07, HW14, HW21, HW27, HW29, HWSSR01, HWSSR03, HWSSR09, HWSSR11, HWSSR12, OSU 2, OSU 4 e HNCA 1. Deste modo, os 16 primers foram selecionados por apresentarem bandas definidas e reprodutibilidade dos fragmentos entre as amostras amplificadas.

Os resultados obtidos a partir da análise dos géis foram quanto à presença e ausência de cada alelo para cada marcador, seguido da frequência alélica. Esses foram compilados pelo método de agrupamento UPGMA (que trata da ligação média entre grupos) e para obtenção da matriz de Jaccard (Figura 5) e do dendrograma (Figura 6), visando identificar a relação da similaridade genética entre todos os biótipos.

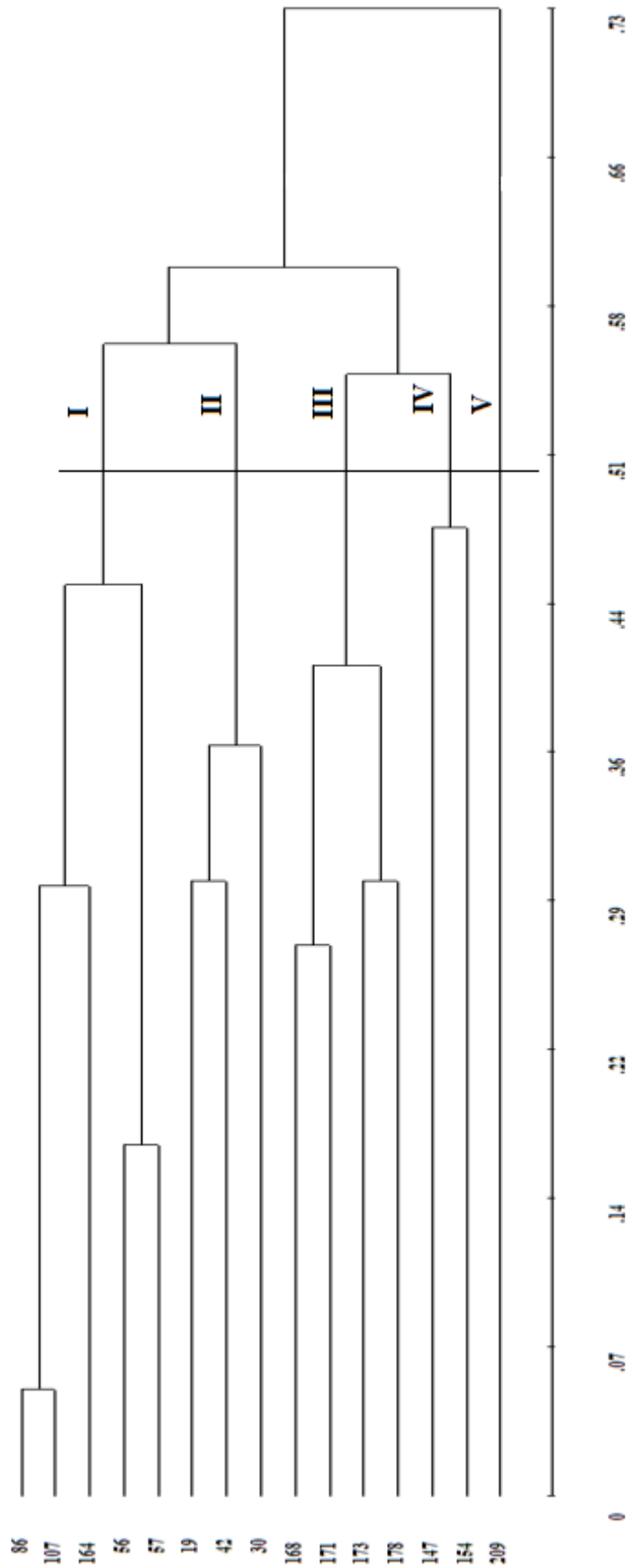
A análise de correlação cofenética obtida foi de 0,84, indicando que os resultados obtidos foram eficientes, uma vez que esta análise verifica a medida de distorção entre os valores da matriz inicial de similaridade e aqueles derivados do dendrograma. Ressalta-se que a estimativa de correlação cofenética varia de zero (0) a um (1) e, quanto maior for o valor obtido para este coeficiente, maior a representatividade do dendrograma em relação à matriz de distâncias genéticas (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011).

Figura 5. Matriz de Jaccard evidenciando as distâncias entre os 15 biótipos avaliados. Os números da primeira linha e primeira coluna correspondem aos biótipos (19) DIO 01, (30) MIS 01, (42) ITA 01, (56) BOM 05, (57) MAR 02, (86) POP 06, (107) IND 01, (147) TUP 02, (154) SAB 01, (164) JAR 04, (168) CAR 01, (171) QUEV 04, (173) JUC 05, (178) BAG 04 e (209) PON 03. Passo Fundo – 2017

Biótipos	19	30	42	56	57	86	107	147	154	164	168	171	173	178	209
19	0														
30	0,4231	0													
42	0,3044	0,32	0												
56	0,5185	0,5172	0,36	0											
57	0,5714	0,5172	0,4231	0,1739	0										
86	0,6897	0,6333	0,5556	0,4	0,3333	0									
107	0,6786	0,6667	0,5926	0,44	0,375	0,0526	0								
147	0,6786	0,6667	0,5926	0,6552	0,6552	0,52	0,5	0							
154	0,6071	0,7273	0,6667	0,7188	0,7188	0,5556	0,5385	0,48	0						
164	0,5769	0,6207	0,6429	0,6071	0,5556	0,3182	0,2857	0,5	0,48	0					
168	0,6071	0,6452	0,6667	0,5862	0,5862	0,5	0,48	0,5926	0,5185	0,4167	0				
171	0,5769	0,7097	0,7333	0,6552	0,6552	0,6296	0,6154	0,6667	0,5385	0,56	0,2727	0			
173	0,6552	0,6452	0,5714	0,5862	0,5862	0,5	0,5385	0,5926	0,4615	0,6429	0,3333	0,4167	0		
178	0,6429	0,7188	0,6071	0,6667	0,6667	0,5926	0,5769	0,5769	0,5	0,6296	0,375	0,52	0,3044	0	
209	0,8214	0,875	0,7857	0,75	0,7931	0,7308	0,72	0,6667	0,7857	0,8148	0,6923	0,8148	0,64	0,4286	0

Fonte: Dados do autor.

Figura 6. Dendrograma de distância genética obtido a partir do Coeficiente de Jaccard, para os 15 biótipos avaliados. Biótipos (86) POP 06, (107) IND 01, (164) JAR 04, (56) BOM 05, (57) MAR 02, (19) DIO 01, (42) ITA 01, (30) MIS 01, (168) CAR 01, (171) QUEV 04, (173) JUC 05, (178) BAG 04, (147) TUP 02, (154) SAB 01 e (209) PON 03. O ponto de corte 0,62 indica a formação dos grupos I e II. Passo Fundo - 2017



Fonte: Dados do autor.

O dendrograma evidenciou a diversidade do material analisado, em que se verifica o maior valor de similaridade entre DIO 01 e TUP 02 (82,62%) e o menor entre POP 06 e IND 01 (7,14%). Cinco grupos foram formados utilizando a fórmula proposta por Mojena (1977), obtendo-se o valor de ponto de corte de 0,50. Dos cinco grupos formados, o grupo I incorporou-se os biótipos POP 06 (MS), IND 01 (MS), JAR 04 (RS), BON 05 (MS) e MAR 02 (MS). O grupo II foi formado pelos biótipos DIO 01 (PR), ITA 01 (MS) e MIS 01 (PR). No grupo II, compuseram os biótipos CAR 01 (RS), QUEV 04 (RS), JUC 05 (RS) e BAG 04 (RS). Já o grupo IV foi formado pelos biótipos TUP 02 (RS) e SAB 01 (RS), e o grupo V foi composto somente pelo biótipo PON 03 (RS), chamando a atenção por ser o único biótipo suscetível estudado. A formação dos distintos grupos indicam a diversidade genética dos materiais estudados, pois, no grupo I há quatro biótipos do MS e um do RS, no grupo II dois biótipos do PR e um do MS. Já nos grupos II e IV, todos os biótipos são oriundos do RS, no entanto, os valores de distância genética são elevados (Figura 3), confirmando a elevada variabilidade genética dos biótipos. O coeficiente médio de similaridade obtido foi de 54,24%, confirmando a elevada diversidade entre os biótipos analisados a partir dos marcadores moleculares microsatélites empregados. Os valores do número de alelos variaram de um a quatro, sendo o número médio de alelos 2,68 (Tabela 12).

Os resultados obtidos no dendrograma apresentam de certa forma relação entre a similaridade genética obtida em função da distribuição geográfica dos biótipos. No entanto, nota-se que há distância genética entre indivíduos geograficamente mais próximos, e da mesma forma há proximidade genética entre indivíduos geograficamente distantes. Por exemplo, biótipos oriundos dos municípios de Quevedos, Tupanciretã e Júlio de Castilhos, apresentam índice de distância genética próximos de 55 e 65%. Esses resultados se relacionam intimamente com a elevada variabilidade genética existente na espécie. Em comparação entre as espécies de *Conyza canadensis*, *C. bonariensis* e *C. sumatrensis*, o maior número de alelos encontrado foi em *C. sumatrensis*, que possivelmente é a espécie com maior diversidade genética entre as três estudadas (MAROCHIO et al., 2017).

Os valores do PIC variaram de 0,0 a 0,68 sendo o valor médio de 0,44. A faixa de valores obtida neste trabalho está de acordo com diversos estudos anteriores. Marcadores microsatélite utilizados para estudar a variabilidade genética em

populações de tomate, encontrou PIC médio de 0,63, com valor máximo de 0,81 e mínimo de 0,17 (AGUIRRE et al., 2017). Ainda, o valor médio inferior encontrado no presente estudo deve-se a maior quantidade de marcadores polimórficos utilizados em comparação aos demais, o que explica o valor médio de PIC inferior. Ainda, o valor de 0,44 corrobora com os resultados obtidos pelo coeficiente de similaridade de Jaccard. Isso porque o PIC é um indicador da capacidade informativa de um marcador em estudos genéticos (segregação, identificação de populações e controle de paternidade). Seu cálculo depende do número de alelos, das suas frequências e do tamanho da amostra. Segundo a classificação de Botstein et al. (1980), marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, com valores entre 0,25 e 0,50 informativos medianamente, e com valores inferiores a 0,25, pouco informativos. Na Tabela 4 pode-se observar o número de alelos amplificados em cada um dos 16 *primers* analisados. Os maiores números de alelos observados foram para os primers HW21, HWSSR12 e OSU 2, apresentando 4 alelos nas amostras de *C. sumatrensis*.

Tabela 12. Marcadores polimórficos utilizados, número de alelos, tamanho aproximado do fragmento e Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC) obtidos. Passo Fundo - 2017

Primer	Número de Alelos	Tamanho médio dos fragmentos (pb)	PIC
HW02	3	188	0,55
HW04	3	211	0,45
HW06	3	230	0,56
HW07	1	229	0
HW14	1	209	0
HW21	4	174	0,53
HW27	3	183	0,67
HW29	1	216	0
HWSSR01	2	176	0,45
HWSSR03	2	190	0,48
HWSSR09	3	202	0,59
HWSSR11	3	190	0,48

HWSSR12	4	273	0,68
OSU 2	4	17	0,75
OSU 4	3	225	0,26
HNCA 1	3	102	0,65

Fonte: Dados do autor.

O sistema de reprodução da espécie também exerce grande influência na alta diferenciação genética entre populações. Para espécies que apresentam autopolinização é esperado encontrar maior variabilidade genética, principalmente pela baixa taxa de cruzamento entre os indivíduos (HAMRICK; GODT, 1996). A ocorrência de baixo fluxo gênico contribui para determinar maior diferenciação entre os indivíduos. A elevada variabilidade genética encontrada nas populações avaliadas indica que há maior chance de se encontrar indivíduos que respondem de maneira diferente à pressão de seleção exercidas no ambiente, como exemplo a aplicação de herbicidas. A existência de variabilidade genética dentro de uma população aumenta a chance de indivíduos responderem diferentemente frente a alterações no ambiente, de modo que isso garanta a preservação da espécie (ALLENDORF; LUIKART, 2007). Entretanto, em populações de plantas daninhas com elevada diversidade genética, há maior chance de serem selecionados indivíduos que não sofrerão custo adaptativo devido a efeitos deletérios, garantindo a preservação e perpetuação destes indivíduos (MAROCHIO et al., 2017). A estruturação genética das populações de *C. sumatrensis* pode indicar que provavelmente as diferentes populações devem requerer diferentes estratégias de manejo para a obtenção de sucesso no controle das plantas.

A formação de quatro grupos para os biótipos resistentes, com distância genética de 50%, pode estar indicando que a ação do herbicida na seleção dos biótipos de *C. sumatrensis* resistentes, não está selecionando os mesmos alelos, ou a mesma frequência destes alelos nos locos microssatélites analisados, de maneira uniforme nas populações resistentes. Em populações de *C. sumatrensis* oriundas somente do estado do Paraná, os resultados encontrados foram semelhantes aos do presente estudo, havendo elevada variabilidade genética entre os biótipos resistentes ao glifosato (MAROCHIO et al., 2017). No entanto, para este mesmo autor, biótipos suscetíveis permaneceram em

grupos juntamente com os biótipos resistentes, de maneira diferente dos resultados encontrados neste trabalho (MAROCHIO et al., 2017).

Para *C. canadensis*, estudadas com o objetivo de investigar a evolução e disseminação da resistência ao glifosato, Okada et al. (2013) encontrou múltiplas evidências para tais objetivos, confirmando a relação existente com os dados obtidos neste trabalho com a variabilidade genética encontrada nos biótipos resistentes de *C. sumatrensis*. Assim, é possível que a diversidade genética pré-existente nas populações estudadas, aliado a diferentes práticas de manejo adotadas, possa estar influenciando a um processo de seleção heterogenia nos biótipos resistentes.

Outra importante informação que pode estar envolvendo os resultados de pesquisas relacionadas com a variabilidade genética de populações de *Conyza* spp. resistentes ao glifosato, são os diferentes mecanismos de resistência encontrados nas populações. O mecanismo de resistência ao glifosato pode ser relacionado ou não relacionado ao local de ação do herbicida (SAMMONS; GAINES, 2014). Desta forma, para *Conyza* spp., os mecanismos de resistência relatados na literatura envolvem a superexpressão da EPSPs, sequestro no vacúolo, diferencial translocação e metabolização do herbicida (FENG et al., 2004; GE et al., 2010; GONZÁLES-TORRALVA et al., 2012; TANI; CHACHALIS; TRAVLOS, 2015). Desta forma, torna-se evidente a ocorrência de diferentes mecanismos de resistência associados ao glifosato, o que pode estar influenciando o processo de seleção diferenciada de populações resistentes.

6.6 Conclusões

Há ampla variabilidade genética entre as populações de *Conyza sumatrensis*, coletadas em diferentes regiões geográficas no Brasil.

O único biótipo suscetível estudado permaneceu sozinho em um grupo, revelando ser geneticamente diferente aos demais estudados. Os demais biótipos formaram quatro distintos grupos, indicando a diversidade genética selecionada pela ação do herbicida.

7 CAPÍTULO V

Análise da expressão de genes relacionados ao mecanismo de resistência de *Conyza sumatrensis* ao herbicida glifosato.

7.1 Resumo

A elucidação do mecanismo de resistência de plantas daninhas a herbicidas é importante para a elaboração de práticas de manejo, entretanto, não há relatos sobre o mecanismo de resistência de *Conyza sumatrensis* ao herbicida glifosato. Objetivou-se com este trabalho, investigar o mecanismo de resistência de biótipos de *C. sumatrensis* resistente ao herbicida glifosato, através da determinação dos níveis de expressão dos genes constitutivos *EPSPs*, *M11* e *M7*. Avaliou-se dois biótipos de *C. sumatrensis*, sendo um resistente e outro suscetível ao glifosato. Os tratamentos constaram da ausência ou aplicação de duas doses do herbicida glifosato (1080 e 8640 g e.a. ha⁻¹). As plantas foram coletadas aos 1 e 4 dias após a aplicação dos tratamentos. A análise da expressão do genes referência foi realizada utilizando como referência o gene da Actina. Foram avaliados a expressão dos genes constitutivos *EPSPs*, gene codificador da enzima *EPSPs*, *M7* e *M11* genes de proteínas transportadoras ABC, por meio de reação de RT-qPCR. Não foi observada diferença na expressão relativa do gene *EPSPs* entre as populações suscetível e resistente, tratadas ou não tratadas com glifosato. A avaliação da expressão relativa dos genes *M7* e *M11* revelou que ambos os genes apresentaram expressão relativa superior no biótipo resistente com a aplicação do glifosato em ambas as doses. Assim, pode se concluir que o gene *EPSPs* não está envolvido com o mecanismo de resistência ao glifosato, e os genes *M7* e *M11* apresentam expressão relativa superior no biótipo resistente, revelando relação entre a superexpressão destes genes com a resistência do biótipo de *C. sumatrensis* estudado.

Palavras-chave: 1. Buva. 2. Superexpressão. 3. *EPSPs*. 4. *M7*. 5. *M11*.

7.2 Abstract

The elucidation of the mechanism of resistance of weeds to herbicides is important for the elaboration of management practices, however, there are no reports on the mechanism of resistance of *Conyza sumatrensis* to the herbicide glyphosate. The objective of this work was to investigate the resistance mechanism in *C. sumatrensis* biotype resistant to glyphosate by determining the expression levels of the constitutive genes *EPSPs*, *M11* and *M7*. Two biotypes of *C. sumatrensis* were evaluated, one resistant and one susceptible to glyphosate. Treatments consisted of the absence or application of two doses of the herbicide glyphosate (1080 and 8640 g a.e. ha⁻¹). The plants were collected at 1 and 4 days after application of the treatments. Analysis of the reference gene expression was performed using the Actin gene as a reference. We evaluated the expression of the constitutive genes *EPSPs*, gene encoding the EPSPs enzyme, *M7* and *M11* genes of ABC carrier proteins, by means of RT-qPCR reaction. No difference was observed in the relative expression of *EPSPs* gene between susceptible and resistant populations, treated or not treated with glyphosate. The evaluation of the relative expression of the *M7* and *M11* genes revealed that both genes had superior relative expression in the resistant biotype with application of glyphosate at both doses. Thus, it can be concluded that the *EPSPs* gene is not involved with the mechanism of resistance to glyphosate, and the *M7* and *M11* genes present superior relative expression in the resistant biotype, revealing relationship between the overexpression of these genes and the resistance of the *C. sumatrensis* biotype studied.

Key-words: 1. Sumatran fleabane. 2. Overexpression. 3. *EPSPs*. 4. *M7*. 5. *M11*.

7.3 Introdução

Ao longo dos últimos anos, a agricultura mundial presencia mais intensamente a evolução de populações de plantas daninhas resistentes aos herbicidas nos diferentes continentes do mundo. O glifosato é o herbicida mais utilizado mundialmente no

controle de plantas daninhas, devido a inúmeras razões: elevada eficácia, amplo espectro de controle, baixo custo, segurança ambiental, dentre outros. No entanto, o uso excessivo deste herbicida exerce elevada pressão de seleção sobre as mais variadas espécies de plantas daninhas, selecionando biótipos resistentes ao glifosato.

Resistência a herbicidas normalmente ocorre com as populações de plantas daninhas como consequência da intensa pressão de seleção exercida pela aplicação de um mesmo herbicida e/ou herbicidas com mesmo mecanismo de ação. A resistência é um clássico exemplo de seleção de populações, em função do uso de altas doses, repetidas aplicações durante o mesmo ciclo de cultivo e ausência de rotação de herbicidas com mecanismo de ação distinto (DINELLI et al., 2008). Em função disto, existem 293 casos de resistência ao glifosato em todo o mundo, ocorridos principalmente em culturas geneticamente modificadas resistentes ao herbicida (HEAP, 2018).

Conyza sumatrensis é uma espécie de planta daninha pertencente a família Asteraceae, apresenta resistência ao glifosato, e juntamente com *C. canadensis* e *C. bonariensis* são as plantas daninhas mais importantes e problemáticas em diversas culturas agrícolas (CHACHALIS; TRAVLOS, 2014). Em nível mundial, *C. sumatrensis* apresenta além de resistência ao glifosato, também aos herbicidas clorimuro, paraquate e diquate. No Brasil possui resistência simples ao glifosato, chlorimuron e paraquat; e resistência múltipla a glifosato e clorimuroa (HEAP, 2018).

O glifosato atua como inibidor da enzima 5-enolpiruvil shiquimato-3-fosfato sintetase (*EPSPs*), enzima chave na rota do ácido chiquímico que catalisa a síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, e outros compostos usados no metabolismo secundário em algas, plantas, bactérias e fungos (BENTLEY, 1990; DUKE; POWLES, 2008; KISHORE; SHAH, 1988).

O mecanismo de resistência ao glifosato pode estar relacionado ou não com o local de ação do herbicida (SAMMOS; GAINES, 2014). Mecanismo de resistência relacionado ao local de ação do herbicida pode envolver mutação pontual no gene que codifica a expressão da enzima *EPSPs*, ou a superexpressão do gene *EPSPs* (GAINES et al., 2010; KAUNDUM et al., 2008; TANI et al., 2015; YU et al., 2007). Já o mecanismo de resistência não relacionado ao local de ação do herbicida, pode ser

resultado de um simples mecanismo ou da combinação de dois ou mais mecanismos, todos resultam na redução da quantidade efetiva do herbicida que realmente chega ao seu local de ação (TANI et al., 2015). Este mecanismo pode incluir redução da translocação e absorção do herbicida; sequestro no vacúolo e por consequência inativação do herbicida; e rápida metabolização e detoxificação do herbicida (BUSI; VILA-AIUB; POWLES, 2010; GE et al., 2010; GONZALES-TORRALVA et al., 2012; VILA-AIUB et al., 2012).

Em *C. canadensis* e *C. bonariensis*, os mecanismos de resistência ao glifosato relatados estão relacionados com a superexpressão da EPSPs, sequestro no vacúolo, translocação diferencial e metabolização (FENG et al., 2004; GE et al., 2010; GONZÁLES-TORRALVA et al., 2012; TANI et al., 2015). Para *C. sumatrensis*, não há relato de mecanismos de resistência ao glifosato. No entanto, hipotetiza-se que o mecanismo de resistência seja similar ao das outras espécies.

O sequestro no vacúolo, aliado a superexpressão da EPSPs, revela-se serem os prováveis mecanismos de resistência de *C. sumatrensis* ao glifosato. De maneira indireta, a investigação do envolvimento do sequestro no vacúolo como mecanismo de resistência, pode ser realizada através da expressão de genes promotores de proteínas responsáveis por este sequestro (TANI et al., 2015). Grande família de genes de proteínas de transportes ABC (ATP-binding cassette) é comum no genoma de plantas, requerendo ATP para suas funções e transportar uma variedade de pequenas moléculas através de membranas (REA, 2007; VERRIER et al., 2008). Enquanto todas as plantas possuem capacidade de transportar glifosato através da membrana do tonoplasto, este processo pode ser mais eficiente em biótipos resistentes. A principal razão para este fato é a superexpressão dos genes que regulam as proteínas transportadoras ABC, que são hábeis em transportar rapidamente o glifosato até o vacúolo em biótipos resistentes (GE et al., 2011).

No entanto, em populações Brasileiras de plantas daninhas do gênero *Conyza*, foi identificado que há diferencial translocação do glifosato em *C. bonariensis* (FERREIRA et al 2008), mas este mecanismo de resistência ainda permanece obscuro principalmente para *C. sumatrensis*. Embora se encontre na literatura hipóteses de explicações, observa-se que o mecanismo de resistência de *Conyza* spp. ao glifosato

ainda não está totalmente elucidado, havendo a necessidade de trabalhos específicos a nível molecular, a fim de preencher esta lacuna do conhecimento.

Frente ao cenário exposto, objetivou-se com este trabalho, investigar o mecanismo de resistência de biótipos de *C. sumatrensis* resistente e suscetível ao herbicida glifosato, através da determinação dos níveis de expressão dos genes constitutivos *EPSPs*, *M11* e *M7*.

7.4 Material e Métodos

7.4.1 Material Vegetal

Para a realização deste estudo, foi utilizada uma população de *Conyza sumatrensis* resistente ao herbicida glifosato e outra suscetível ao mesmo herbicida, previamente identificadas em trabalho publicado na literatura (Tabela 13) (SANTOS et al., 2014). Os biótipos foram semeados em bandejas plásticas, e quando ocorrida a emergência, as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade volumétrica de 500 mL. Os biótipos foram mantidos em casa-de-vegetação e irrigados diariamente até atingir o estágio de desenvolvimento adequado para o prosseguimento do experimento.

Tabela 13. Identificação do município e das coordenadas do local de coleta dos biótipos de *Conyza sumatrensis* suscetível e resistente ao herbicida glifosato (SANTOS et al., 2014)

Código	Município	Coordenadas	Glifosato
Biótipo 2	Pontão	Lat: 28°00'20.40'' N Lon: 52°45'12.40'' E	Suscetível
Biótipo 5	Carazinho	Lat: 28°18'06.51'' N Lon: 52°53'41.31'' E	Resistente

Fonte: Santos et al., (2014).

7.4.2 Aplicação dos herbicidas e coleta do material vegetal

Quando atingiram o estágio de 4 a 6 folhas, as plantas foram tratadas com o herbicida glifosato em duas doses: 1X (1080 g e.a. ha⁻¹) e 8X (8640 g e.a. ha⁻¹), e mais um tratamento testemunha sem a aplicação do herbicida. Como produto comercial, foi utilizado ZAPP QI 620®. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com três repetições de cada tratamento. Para realizar a pulverização do herbicida, foi utilizado pulverizador costal, pressurizado a CO₂, calibrado para proporcionar volume de aplicação de 150L ha⁻¹ de calda herbicida, equipado com pontas de pulverização tipo leque 110.015.

Foram coletadas folhas de cada tratamento aos 1 e 4 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT), seguindo o mesmo padrão de coleta, sendo coletadas as folhas intermediárias de cada planta. Após a coleta das folhas, as mesmas foram acondicionadas em papel alumínio, devidamente identificadas e imediatamente submersas em nitrogênio líquido em uma caixa de isopor, onde posteriormente foram mantidas em ultrafreezer a -80°C até o momento da extração do RNA. Foram coletadas três replicatas biológicas de cada tratamento.

7.4.3 Extração do RNA e síntese do cDNA

A extração do RNA das folhas foi realizada com a utilização do kit de extração *NucleoSpin® RNA Plant* (Machery-Nagel, Alemanha) seguindo instruções do fabricante. A quantificação e determinação da pureza das amostras foi avaliada utilizando nanoespectrofotômetro NanoDropTM2000 (Thermo Scientific, EUA), sendo as amostras mensuradas na absorbância de A260 e A280.

Para eliminação da contaminação com DNA genômico, as amostras foram tratadas com RQ1 RNase Free DNase (Promega, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Para a construção do cDNA foi utilizado o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit®* (Applied Biosystems, Estados Unidos), seguindo as instruções do fabricante.

7.4.4 Análise em RT-qPCR

Os *primers* dos genes utilizados, tanto de referência, quanto os genes alvos, estão listados na Tabela 14. Os genes *M11*, *M7* e *Actina* (gene referência) foram selecionados a partir do trabalho realizado por Peng et al., (2010). O gene *EPSPs* foi utilizado com base no trabalho realizado por Tani et al., (2015).

Tabela 14. Relação dos genes e sequência dos *primers* dos quatro genes utilizados para a análise de RT-PCR em tempo real. Passo Fundo - 2017

Gene	Sequência <i>forward</i>	Sequência <i>reverse</i>
<i>Actina</i>	5'-gtggttcaactatgttcctg-3'	5'-cttagaagcatttctctgtgg-3'
<i>M11</i>	5'-atgctgtcttctttacctttgc-3'	5'-cgacttcccactaccagttcttc-3'
<i>M7</i>	5'-tcatgcgtgttgataccgt-3'	5'-accaagaagtgaggcgatgc-3'
<i>EPSPs</i>	5'-ccaccaccgagaaacctca-3'	5'-catcctcctcaacgtttagcc-3'

Fonte: Dados do autor.

Nota: *Actina*: gene de referência; *M11* e *M7*: genes de proteínas transportadores ABC; *EPSPs*: gene promotor da enzima *EPSPs*.

O cDNA obtido foi amplificado por PCR em tempo real (RT-qPCR) usando –se o kit *Fast SYBR® Green Master Mix* (Applied Biosystems). A análise de RT-qPCR foi realizada com equipamento Step One Plus ® (Applied Biosystems) em placas contendo 96 poços *MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate* (Applied Biosystems) com selador *MicroAmp® Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems). As concentrações dos *primers* e cDNA foram 5 µM e 20 ng, respectivamente. A reação de RT-PCR foi realizada com três replicatas técnicas das amostras.

As reações foram realizadas em volume final de 20 µL, formado por 2 µL da amostra de cDNA, 10 µL de *SYBR® Green Master Mix*, 2 µL da combinação de *primers forward e reverse*; e 6 µL de água Mili-Q.

As etapas de amplificação incluíram um ciclo inicial de 95°C durante 20 s, seguido de uma sequência de 40 ciclos: iniciando com 95°C por 3 s, 60°C por 30 s, 95°C por 15 s, 60°C por 60 s e 95°C por 15 s. Para identificação dos produtos de PCR, a curva de *melting* variou de 60°C a 95°C.

7.4.5 Análise da expressão gênica

O cálculo de expressão relativa foi realizado através do método 2-($\Delta\Delta Ct$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando o gene de referência Actina para normalização dos dados obtidos por RT-qPCR. As médias foram comparadas pelo desvio padrão e calculado o intervalo de confiança para todas as médias.

7.5 Resultados e Discussão

Os experimentos de RT-qPCR revelaram que em todos os tratamentos (controle e plantas tratadas com glifosato) todos os genes estudados estavam presentes em ambos os biótipos.

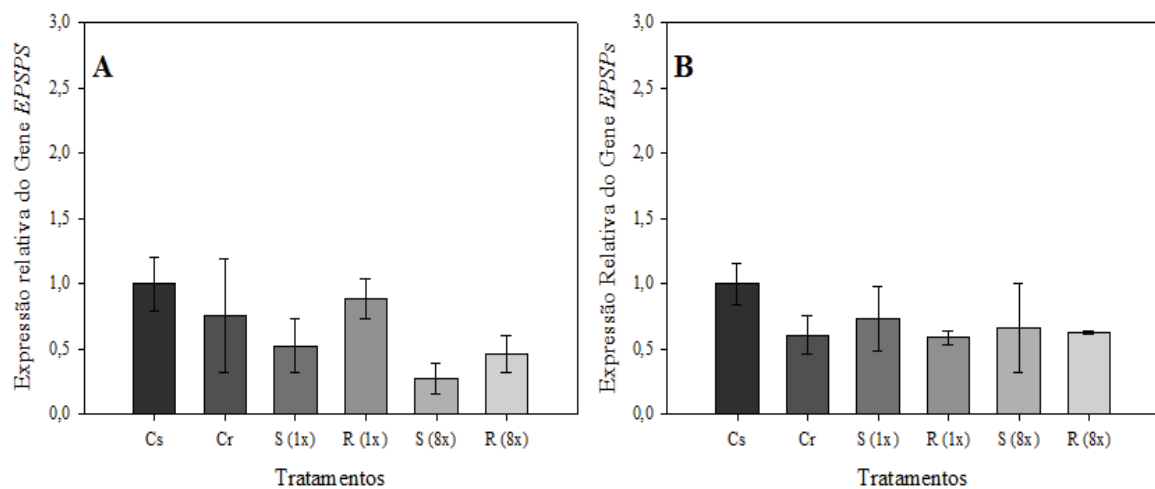
7.5.1 Análise da expressão do gene *EPSPs*

A expressão relativa do gene *EPSPs* não foi alterada pelos tratamentos avaliados (Figura 7). Tanto na população suscetível quanto na resistente a expressão foi semelhante. A expressão relativa do gene *EPSPs* não foi afetada pela aplicação de glifosato. Dessa forma, pode-se afirmar que a maior expressão ou maior número de cópias do gene *EPSPs* não atuam como mecanismo de resistência ao glifosato nessa população de *C. sumatrensis*.

A superexpressão do gene *EPSPs* foi relacionada como mecanismo de resistência ao glifosato em *Amaranthus palmeri* e *Lolium rigidum* (BAERSON et al., 2002; GAINES et al., 2010). O alto nível de expressão do gene *EPSPs* é produzido pela massiva amplificação do número de cópias do gene, e comumente, ocorre custo

adaptativo da espécie em função da superexpressão do gene. Por este motivo, a habilidade competitiva e/ou a capacidade de sobrevivência e dispersão são reduzidas em função do ambiente (POWLES; YU, 2010). Os resultados do presente trabalho não se relacionam com encontrados em *C. canadensis* e *C. bonariensis*, onde a superexpressão do gene *EPSPs* está relacionada com o mecanismo de resistência ao glifosato (DINELLI et al., 2008; TANI et al., 2015). Desta forma, provavelmente outros mecanismos não relacionados ao local de ação do herbicida estejam associados com a resistência do biótipo de *C. sumatrensis* estudado. Pois, os inúmeros trabalhos com plantas daninhas do gênero *Conyza*, onde o mecanismo de resistência está relacionado com a diferencial translocação do herbicida, outros mecanismos atuam em conjunto (POWLES; YU, 2010).

Figura 7. Expressão relativa do gene *EPSPs* em plantas de *Conyza sumatrensis* suscetível (S) e resistente (R) ao herbicida glifosato, em resposta à aplicação do glifosato. Figura A: expressão relativa a 1 DAT; Figura B: expressão relativa a 4 DAT. C: controle sem aplicação do herbicida; 1x: aplicação de 1x a dose do herbicida; 8x: aplicação de 8x a dose do herbicida. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). Passo Fundo - 2017



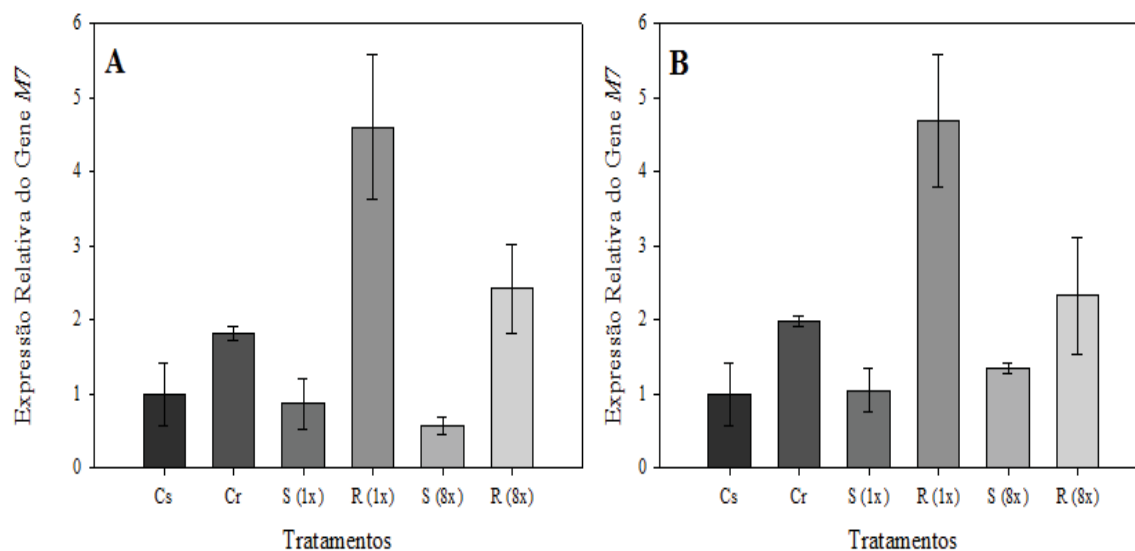
Fonte: Dados do autor.

7.5.2 Análise da expressão dos genes *M7* e *M11*

A avaliação da expressão dos genes de proteínas transportadoras ABC, revelou que ambos os genes apresentaram expressão relativa superior no biótipo resistente com a aplicação do glifosato em ambas as doses testadas.

O gene *M7* apresentou a 1 dia após a aplicação do herbicida (DAT) 4,6 vezes a expressão relativa no biótipo resistente quando aplicado 1x a dose do glifosato em relação ao biótipo suscetível não tratado com o herbicida (Figura 8A). Quando comparado com a aplicação de 1x a dose do herbicida no biótipo suscetível, a expressão foi 5,28 vezes superior. Com a aplicação de 8x a dose do glifosato, o gene *M7* foi expresso 2,41 vezes maior em relação biótipo suscetível sem herbicida, e 4,3 vezes em relação ao biótipo suscetível com a aplicação do glifosato a 8x.

Figura 8. Expressão relativa do gene *M7* em plantas de *Conyza sumatrensis* suscetível (S) e resistente (R) ao herbicida glifosato, em resposta à aplicação do glifosato. Fugura **A**: expressão relativa a 1 DAT; Figura **B**: expressão relativa a 4 DAT. C: controle sem aplicação do herbicida; 1x: aplicação de 1x a dose do herbicida; 8x: aplicação de 8x a dose do herbicida. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). Passo Fundo - 2017



Fonte: Dados do autor.

Quando avaliada a expressão do gene *M7* aos 4 DAT (Figura 8B), o padrão de expressão relativa do gene permaneceu similar a avaliação a 1 DAT nas duas doses do herbicida. No biótipo resistente, a aplicação de 1x a dose do glifosato a expressão relativa foi 4,69 vezes superior em relação ao mesmo tratamento no biótipo suscetível. Analisando a expressão relativa aos 4 DAT com a aplicação de 8x a dose do glifosato, o biótipo resistente apresentou 2,33 vezes superior a expressão em relação ao biótipo suscetível sem herbicida. Em relação ao mesmo tratamento, a expressão no biótipo resistente foi 1,73 vezes maior comparado com o suscetível.

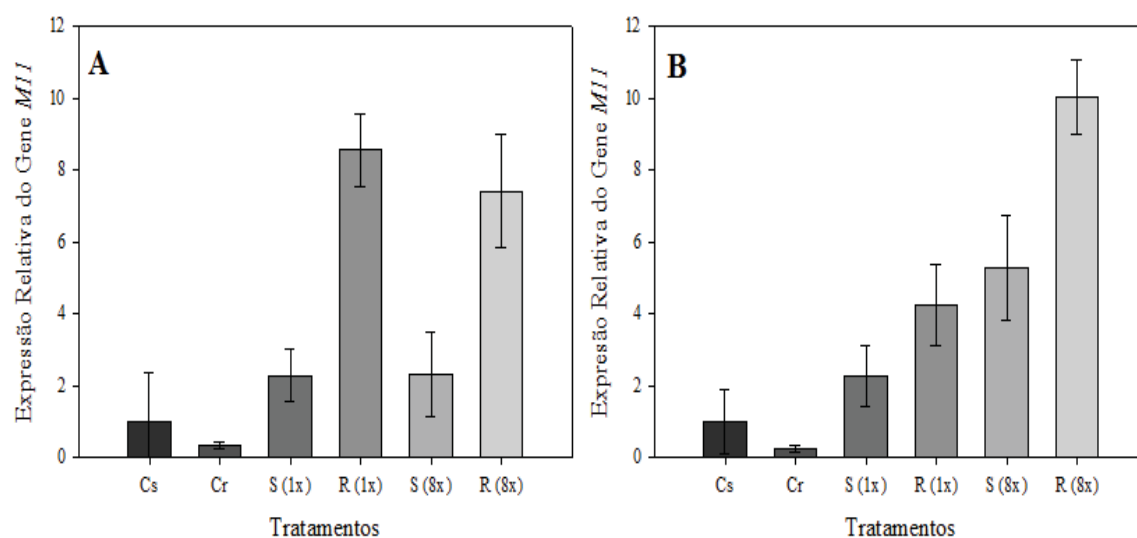
De maneira geral, pode-se observar que a aplicação do glifosato nas duas doses promoveu a expressão do gene *M7* no biótipo resistente, tanto quando avaliado a 1 DAT, quanto aos 4 DAT. A maior expressão ocorrida foi quando aplicado 1x a dose do glifosato, mantendo-se no mesmo nível 4 dias após a aplicação. Com a aplicação de 8x a dose, a expressão do gene foi menor, no entanto foi significativamente superior do que o nível observado no tratamento sem herbicida para os dois biótipos, e a 8x no biótipo suscetível. Nas duas épocas de avaliação (1 e 4 DAT), no biótipo resistente o gene *M7* apresentou expressão relativa superior ao biótipo suscetível no tratamento sem herbicida. Observou-se aproximadamente o dobro da expressão no biótipo resistente. Biótipos de *Conyza canadensis* resistentes ao glifosato, apresentaram expressão do gene *M7* superior sem a aplicação do glifosato (PENG et al., 2010; TANI et al., 2015).

O gene *M7* foi encontrado com maior expressão em biótipo de *Conyza canadensis* resistente ao glifosato, no entanto, a 1 DAT a expressão foi superior com a aplicação do herbicida. Já aos 8 DAT, o maior nível de expressão foi identificado no biótipo resistente sem tratamento herbicida (TANI et al., 2015). Ainda para *C. canadensis*, a expressão do gene *M7* foi aproximadamente 8 vezes superior no biótipo resistente em relação ao biótipo suscetível, ambos tratados com glifosato (PENG et al., 2010). O gene *M7* foi expresso em níveis maiores a 1 DAT, sendo reduzido na avaliação aos 4 DAT. Este comportamento também foi observado em trabalho similar realizado em *C. canadensis* (TANI et al., 2015).

Na avaliação do gene *M11* a expressão relativa foi superior no biótipo resistente (Figura 9). No entanto, nos tratamentos onde houve a aplicação do glifosato, os dois biótipos elevaram a expressão do gene. De maneira contrária ao gene *M7*, o biótipo

resistente apresentou baixa expressão do gene *M11* sem tratamento herbicida. Na avaliação da expressão relativa do gene *M11* a 1 DAT, foi possível observar que no biótipo resistente com aplicação de 1x a dose de glifosato, a expressão foi 8,6 vezes superior em relação ao biótipo suscetível sem herbicida (Figura 9A). Quando se compara o tratamento de 1x à dose nos dois biótipos, a expressão foi 3,77 vezes maior no biótipo resistente, indicando que mesmo no biótipo suscetível ocorre o aumento da expressão deste gene. Quando foi aplicado a dose 8x, a expressão relativa no biótipo resistente em relação ao suscetível sem herbicida foi de 7,42 vezes maior. Sendo que o mesmo comportamento foi observando entre os biótipos no mesmo tratamento.

Figura 9. Expressão relativa do gene *M11* em plantas de *Conyza sumatrensis* suscetível (S) e resistente (R) ao herbicida glifosato, em resposta à aplicação do glifosato. Figura **A**: expressão relativa a 1 DAT; Figura **B**: expressão relativa a 4 DAT. C: controle sem aplicação do herbicida; 1x: aplicação de 1x a dose do herbicida; 8x: aplicação de 8x a dose do herbicida. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$). Passo Fundo - 2017



Fonte: Dados do autor.

A determinação da expressão relativa do gene *M11* aos 4 DAT apresentou comportamento distinto (Figura 9B). No tratamento 1x no biótipo resistente, a expressão do gene reduziu em relação a 1 DAT, sendo 4,24 vezes superior no biótipo resistente. Já para o tratamento onde aplicou-se 8x a dose, a expressão elevou-se, chegando a 10 vezes maior no biótipo resistente em relação ao suscetível sem herbicida.

No biótipo suscetível, o tratamento com 8x a dose elevou a expressão aos 4 DAT. Desta forma tanto para o biótipo resistente, quanto para o suscetível, a aplicação do glifosato promove a expressão do gene *M11*. Embora este fato ocorra, no biótipo resistente o nível de expressão é superior em relação ao suscetível.

A superexpressão do gene *M11* também foi relacionado com a resistência ao glifosato em *Conyza canadensis*, sendo que a aplicação de 8x a dose do glifosato aumentou a expressão do gene (TANI et al., 2015). Em outro trabalho, o gene *M11* foi superexpresso no biótipo suscetível e no resistente em função da aplicação do glifosato, no entanto, a maior expressão foi no biótipo resistente (PENG et al., 2010). Corroborando com os resultados encontrados neste trabalho, 8x a dose do glifosato aplicado em biótipos de *C. canadensis* promoveram expressão relativa superior do gene *M11* em comparação com a 1x a dose (TANI et al., 2015).

A avaliação dos níveis de expressão dos *EPSPs*, *M7* e *M11* realizada com o intuito de relacionar a superexpressão dos genes com um possível mecanismo de resistência de *C. sumatrensis* ao glifosato. Este objetivo foi proposto em razão de haver a ocorrência de resistência de *C. canadensis* ao glifosato devido ao sequestro do herbicida no vacúolo, que ocorre por consequência da superexpressão dos genes que codificam a expressão de proteínas transportadoras ABC (GE et al., 2010; PENG et al., 2010; TANI et al., 2015).

Uma vez que naturalmente as plantas possuem capacidade limitada de metabolizar toxinas, o desenvolvimento de estratégias para detoxificar compostos tem sido parte de mecanismos de evolução das plantas (YUAN; TRANEL; STEWART, 2007). Transportadores ABC são proteínas transmembranas que utilizam energia da hidrólise do ATP para transportar inúmeros substratos através de membranas intracelular e extracelular, incluindo lipídios, xenobióticos, hormônios, metais e produtos do metabolismo secundário (REA, 2007; VERRIER et al., 2008). Ainda, proteínas ABC possuem a capacidade de transportar herbicidas e metabólitos de herbicidas (KLEIN; BURLA; MARTINOIA, 2000).

O mecanismo de resistência de *Conyza* spp. ao glifosato tem sido relacionado a diversos fatores. A superexpressão da *EPSPs* é um dos mecanismos de resistência envolvido relacionado ao local de ação do herbicida (TANI et al., 2015). No entanto, no

presente trabalho não foi identificado diferencial expressão do gene *EPSPs* em comparação entre o biótipo resistente e suscetível, o que revelou que este mecanismo não é o responsável pela resistência desta população de *C. sumatrensis* ao herbicida glifosato. Ainda, o sequestro do glifosato no vacúolo, diferencial translocação e metabolização do herbicida, são os mecanismos de resistência ao glifosato não relacionados ao local de ação do herbicida que já foram relatados na literatura (FENG et al., 2004; GE et al., 2010; GONZÁLES-TORRALVA et al., 2012). A translocação diferencial do glifosato pode estar diretamente relacionada com o sequestro do herbicida no vacúolo, uma vez que o herbicida aplicado permanece nas folhas e não é distribuído para as outras partes da planta (POWLES; YU, 2010).

O sequestro do herbicida do vacúolo é realizado por algumas das proteínas de transportes ABC, e a investigação da expressão de genes codificadores destas proteínas pode ser uma via de investigação do mecanismo de resistência. A identificação de quais os genes relacionados com este processo possibilitou à comunidade científica a realização de trabalhos que objetivam a identificação do mecanismo de resistência de espécies do gênero *Conyza* ao herbicida glifosato (PENG et al., 2010). Estes genes podem estar expressos em maior nível em biótipos resistentes, ou até mesmo serem superexpressos em função da aplicação do herbicida (SHANER, 2009). Dado este que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho, onde o gene *M7* no biótipo resistente o nível de expressão é superior mesmo sem a aplicação do herbicida. Já para o gene *M11*, a superexpressão do gene ocorre devido a aplicação do glifosato, sendo que mesmo no biótipo suscetível o tratamento com glifosato promove a expressão do gene.

Neste trabalho foram selecionados os genes *EPSPs*, *M7* e *M11* para a realização da investigação. A base para esta escolha deu-se em função do gene *EPSPs* codificar a expressão da enzima *EPSPs*, sendo esta o local de ação do glifosato e por haver a ocorrência de superexpressão da *EPSPs* como mecanismo de resistência em plantas do gênero *Conyza* ao glifosato. Já os genes *M7* e *M11*, a escolha ocorreu em função da estreita relação da superexpressão destes genes com a resistência ao glifosato em *C. canadensis* (PENG et al., 2010; TANI et al., 2015). A primeira hipótese de que haveria superexpressão do gene *EPSPs* não se confirmou, já a hipótese do envolvimento dos genes de proteínas transportadoras ABC *M7* e *M11* se confirmaram. Estes resultados

são inovadores para as pesquisas que buscam caracterizar os mecanismos de resistência ao glifosato em *Conyza* spp. no Brasil, uma vez que já foram realizados trabalhos que identificaram a translocação diferencial do glifosato, e a possível relação com o sequestro do herbicida no vacúolo.

Deve-se considerar que é grande o número de proteínas transportadoras ABC nas mais diferentes espécies. Por este motivo necessita-se de maiores evidências que envolvam as proteínas transportadoras ABC nos processos de sequestro no vacúolo e até mesmo na diferencial translocação do glifosato em populações de *Conyza* spp. resistentes ao herbicida glifosato.

No entanto, os resultados obtidos neste trabalho confirmam que há relação entre a superexpressão dos genes de proteínas transportadoras ABC *M7* e *M11*, com o biótipo de *C. sumatrensis* estudado. Trabalhos futuros necessitam ser realizados para se investigar o possível envolvimento de outros genes nesta relação, e avaliar nesta mesma população a dinâmica do sequestro do glifosato no vacúolo através do método de Ressonância Magnética ^{31}P -Nuclear (^{31}P -NMR) (GE et al., 2011).

7.6 Conclusões

A análise da expressão do gene *EPSPs* demonstra que a quantidade de transcritos nas duas populações avaliadas é semelhante e que não há diferença entre plantas tratadas e não tratadas com glifosato. Desta forma pode-se afirmar que a maior expressão do gene *EPSPs* não é a causa da resistência do biótipo de *Conyza sumatrensis* avaliado neste estudo.

Os genes *M7* e *M11* apresentam maior expressão relativa no biótipo resistente. O gene *M7* apresenta expressão superior no biótipo resistente sem a aplicação do glifosato. A expressão deste gene é induzida pela aplicação do herbicida glifosato. O gene *M11* apresenta expressão relativa superior no biótipo resistente quando tratado com glifosato. Desta forma pode-se afirmar que há relação entre a superexpressão dos genes *M7* e *M11* com a resistência do biótipo estudado de *Conyza sumatrensis* ao herbicida glifosato.

8 CONCLUSÃO GERAL

A grande maioria da população de *Conyza* spp. estudada apresenta resistência ao herbicida glifosato, no entanto ainda há populações suscetíveis a este herbicida.

Populações de *Conyza* spp. resistentes ao herbicida glifosato são eficientemente controladas pelos herbicidas glufosinato de amônio, paraquate, diquate e glifosato + saflufenacil, sendo que, 5 cm de estatura é o estágio que apresenta o melhor momento de controle desta espécie.

Não há diferenças de espessura da epiderme e diâmetro dos feixes vasculares entre biótipos de *Conyza sumatrensis* resistente e suscetível ao glifosato, que possam justificar a resistência.

A variabilidade genética entre as populações de *Conyza sumatrensis* é elevada, no entanto, há indícios da utilização de marcadores moleculares que possam identificar indivíduos com resistência ao herbicida glifosato.

O mecanismo de resistência do biótipo de *Conyza sumatrensis* estudado é a superexpressão dos genes *M7* e *M11*, possivelmente envolvendo o sequestro do herbicida no interior do vacúolo celular.

9 REFERÊNCIAS

ADEGAS, F. S.; VARGAS, L.; GAZZIERO, D. L. P.; KARAM, D.; DA SILVA, A. F.; AGOSTINETTO, D. Impacto econômico da resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil. **Circular Técnica – EMBRAPA**, v.132, 2017.

ADU-YEBOAH, P.; MALONE, J. M.; GILL, G.; PRESTON, C. Reduced glyphosate translocation in two glyphosate-resistant populations of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) from fence lines in South Australia. **Weed Science**, v.62, n. 1, p.4-10, 2014.

AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. 2. Ed. Pelotas: Editora UFPel, 2014.

AGUIRRE, N. C.; LÓPEZ, W.; CÁRDENAS, M. O.; CORONADO, Y. M.; CABRERA, F. V. Use of microsatellites for evaluation of genetic diversity in cherry tomato. **Bragantia**, v.76, n. 2, p.220-228, 2017.

ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. 2. Ed. Hoboken: Blackwell Publishing Maden, 2007.

ANDERSEN, M. C. Diaspore morphology and seed dispersal in several wind-dispersed Asteraceae. **American Journal of Botany**, v.80, n. 5, p.487-492, 1993.

AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 09 jan. 2018.

APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. 1. Ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003.

BAERSON, S. R.; RODRIGUES, D. J.; BIEST, N. A.; TRAN, M.; YOU, J. Investigating the mechanism of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). **Weed Science**, v.50, n. 6, p.721-730, 2002.

BARROSO, J.; NAVARRETE, L.; SANCHEZ, D. A. M. Dispersal of *Avena fatua* and *Avena sterilis* patches by natural dissemination, soil tillage and combine harvesters. **Weed Research**, v.46, n. 2, p.118-128, 2006.

BETTS, K. J.; EHLKE, N. J.; WYSE, D. L.; GRONWALD, J. W.; SOMERS, D. A. Mechanism of inheritance of diclofop resistance in italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). **Weed Science**, v.40, n. 2, p.184-189, 1992.

BEGG, G. S.; WISHART, J; YOUNG, M. W.; SQUIRE, G. R.; IANETTA, P. P. M. Genetic structure among arable populations of *Capsella bursapastoris* is linked to functional traits and in-field conditions. **Ecography**, v.35, n. 5, p.446-457, 2012.

BENBROOK, C. M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe**, v.28, n. 3, p.01-15, 2016.

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.

BIANCHI, M. A.; SCHNEIDER, T.; ROCKENBACH, A. P. Avaliação da rapidez e eficácia da associação de saflufenacil e glifosato no controle pós-emergente de buva. In: III SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE USO SUSTENTÁVEL, Botucatu, 2011. **Resumos...** Botucatu: FEPAF, 2011.

BOSSDORF, O.; AUGÉ, H.; LAFUMA, L.; ROGERS, W. E.; SIEMANN, E.; PRATI, D. Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. **Oecologia**, v.5, n. 1, p.1-11, 2005.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, n. 3, p.314-331, 1980.

BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 7p. (Documentos, 3).

BUSI, R.; YU, Q.; BARRET-LENNARD, R.; POWLES, S. B. Long distance pollen-mediated flow of herbicide resistance genes in *Lolium rigidum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.117, n. 8, p.1281-1290, 2008.

BUSI, R.; VILA-AIUB, M. M.; POWLES, S. B. Genetic control of a cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance mechanism in *Lolium rigidum*. **Heredity**, v.106, n. 5, p.817-824, 2011.

CARDINALI, V.C. B.; DIAS, A.C. R.; MUELLER, T. C.; ABERCROMBIE, L.; STEWART JR, C. N.; TORNISIELO, V. L.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Shikimate accumulation, glyphosate absorption and translocation in horseweed biotypes. **Planta Daninha**, v.33, n. 1, p.109-118, 2015.

CARVALHO, L. B.; ALVES, P. L.; GONZALES-TORRALVA, F.; CRUZ-HIPÓLITO, H. E.; ROJANO-DELGADO, A. M.; DE PRADO, R.; GIL-HUMANES, J.; BARRO, F.; DE CASTRO, M. D. Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*, **Journal of Agricultural, Food and Chemistry**, v.60, n. 2, p.615-622, 2012.

CARVALHO, S. J. P.; OVEJERO, R. F. L.; CRISTOFFOLETI, P. J. Crescimento e desenvolvimento de cinco espécies de plantas daninhas do gênero *Amaranthus*. **Bragantia**, v.62, n. 2, p.317-326, 2008.

CASE, C. N.; CRAWLEY, M. J. Effect of interspecific competition and herbivory on the recruitment of an invasive alien plant: *Conyza sumatrensis*. **Biological Invasions**, v.2, n. 2, p.103-110, 2000.

CHACHALIS, D.; TRAVLOS, I.S. Glyphosate resistant weeds in Southern Europe: current status, control strategies and future challenges. In: **Handbook of herbicides: biological activity, classification, and health and environmental implications**. Nova, 2014, p.175-191.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. F. Principais aspectos da resistência de plantas daninhas ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v.21, n. 3, p.507-515, 2003.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; BORGATO, E. A.; NETTO, A. G.; CARVALHO, S. J. P.; NICOLAI, M. Critérios para relato de novos casos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. In: CHRISTOFFOLETI, P.J.; NICOLAI, M. (Eds.) **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Piracicaba: ESALQ, 2016. p.33-41.

CONAB, **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_09_12_10_14_36_boletim_graos_setembro_2017.pdf. Acesso em: 03 abr 2018.

CRUZ, C. D. Programa GENES – Aplicativo computacional em estatística aplicada à genética. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, n. 1, p. -, 1998.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. 1. Ed. Viçosa: Suprema, 2011.

DINELLI, G.; MAROTTI, I.; BONETTI, A.; CATIZONE, P.; URBANO, J. M.; BARNES, J. Physiological and molecular bases of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain. **Weed Research**, v.48, n. 3, p.257-265, 2008.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fesh tissue. **Focus**, v.12, n. 1, p.13-15, 1990.

DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, v.64, n. 4, p.319-325, 2008.

FENG, P. C.; TRAN, M.; CHIU, T.; SAMMONS, R. D.; HECK, G. R.; CAJACOB, C. A. Investigation into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. **Weed Science**, v.52, n. 4, p.498-505, 2004.

FERREIRA M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. 1. Ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995.

FERREIRA, E. A.; SANTOS, J. B.; SILVA, A. A.; OLIVEIRA, J. A.; VARGAS, L. Translocação do glyphosate em biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*). **Planta Daninha**, v.24, n. 2, p.365-370, 2006.

FERREIRA, E. A.; GALON, L.; ASPIAZÚ, I.; SILVA, A. A.; CONCENÇO, G.; SILVA, A. F.; OLIVEIRA, J. A.; VARGAS, L. Glyphosate translocation in Hairy Fleabane (*Conyza bonariensis*) biotypes. **Planta Daninha**, v.26, n. 3, p.637-643, 2008.

FRANKTON, C.; MULLIGAN, G.A. **Weeds of Canada** (revised). 1. Ed. Toronto: NC, 1987.

FRANS, R.; TALBERT, R.; MARX, D.; CROWLEY, H. Experimental design and techniques for measuring and analyzing plant responses to weed control practices. In: CAMPER, N. D. (Ed.) **Research methods in weed science**. 3 ed. Champaign: Southern Weed Science Society, 1986. 37p.

FREITAS, L. B.; BERED, F. **Genética e Evolução Vegetal**. 1 Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003.

GAINES, T. A.; PRESTON, C.; LEACH, J. E.; CHISHOLM, S. T.; SHANER, D. L. Gene amplification is a mechanism for glyphosate resistance evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.107, n. 3, p.1029-1034, 2010.

GAZZIERO, D. L. P.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; VARGAS, L.; KRUSE, N. D.; GALLI, A. J. B.; TREZZI, M. M. Critérios para relatos oficiais estatísticos de biótipos de plantas daninhas resistentes a herbicidas. In: AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. (Eds.) **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Pelotas: UFPel, 2014. p.44-53.

GE, X.; D'AVIGNON, D. A.; ACKERMAN, J. J. H.; SAMMONS, R. D. Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. **Pest Management Science**, v.66, n. 4, p.345-348, 2010.

GE, X.; D'AVIGNON, D. A.; ACKERMAN, J. J. H.; DUNCAN, B.; SPAUR, M. B.; SAMMONS, R. D. 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.; D'AVIGNON, D. A.; ACKERMAN, J. J. H.; SAMMONS, R. D. In Vivo ³¹P-Nuclear Magnetic Resonance Studies of Glyphosate Uptake, Vacuolar Sequestration, and Tonoplast Pump Activity in Glyphosate-Resistant Horseweed. **Plant Physiology**, v.166, n. 3, p.1255-1268, 2014.

GEOLIVRE. Mapas temáticos RS. Disponível em: <<http://www.geolivres.gov.br>>. Acesso em: 17 set. 2011.

GOLDSTEIN, D. B.; SCHLOTTERER, C. **Microsatellites evolution and application**. 1 Ed, Oxford: Oxford University Press, 1998.

GONZÁLES-TORRALVA, F.; GIL-HUMANES, J.; BARRO, F.; BRANTS, I.; DE PRADO, R. Target site mutation and reduced translocation are present in a glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* Lam. Biotype from Spain. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.58, n. -, p.16-22, 2012a.

GONZÁLES-TORRALVA, F.; ROJANO-DELGADO, A. M.; CASTRO, M. D. L.; MULLEDER, N.; DE PRADO, R. Two non-target site mechanisms are involved in glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.) biotypes. **Journal of Plant Physiology**, v.169, n. 17, p.1673-1679, 2012b.

GUIMARÃES, C. T.; PADILHA, L.; SOUZA, I. R. P.; PAIVA, E. **“Fingerprinting” Molecular de Linhagens de Milho**. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. p. 1-4. (Comunicado Técnico, 92).

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences**, v.351, n. 1345, p.1291-1298, 1996.

HAO, J. H.; QIANG, S.; LIU, Q. Q.; CAO, F. Reproductive traits associated with invasiveness in *Conyza sumatrensis*. **Journal of Systematics and Evolution**, v.47, n. 3, p.245-254, 2009.

HETHERINGTON, P. R.; REYNOLDS, T. L.; MARSHALL, G.; KIRKWOOD, R. C. The absorption translocation and distribution of the herbicide glyphosate in maize expressing the CP-4 transgene. **Journal of Experimental Botany**, v.50, n. 339, p.1567-1576, 1999.

HEAP, I. **Internacional survey of herbicide resistant weeds**. Disponível em: <www.weedscience.org>. Acesso em: 23 fev 2018.

HOLM, L. G.; DOLL, J.; HOLM, E.; PANCHO, J.; HERBERGER, J. **World weeds: natural histories and distribution**. Toronto: Wiley, 1997.

HUGH, J. B. Herbicide-Resistant Weeds: Management Tactics and Practices. **Weed Technology**, v.20, n. 3, p.793-814, 2006.

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la Société Vaudoise de Sciences Naturelles**, v.37, n. 142, p.547-579, 1901.

JASIENIUK, M. Constraints on the evolution of glyphosate resistance in weeds. **Resistant Pest Management**, v.7, n. 2, p.31-32, 1995.

JASIENIUK, M.; BRULÉ-BABEL, A. L.; MORRIISON, I. N. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. **Weed Science**, v.44, n. 1, p.176-193, 1996.

JOHNSON, W. G.; GIBSON, K. D. Glyphosate-resistant weeds and resistance management strategies: an Indiana grower perspective. **Weed Technology**, v.20, n. 3, p.768-772, 2006.

JONES, N.; OUGHMAN, H.; THOMAS, H.; PASAKINSKIENE, I. Markers and mapping revisited: finding your gene. **New Phytologist**, v.183, n. 4, p.935-966, 2009.

KANG, J.; PARK, J.; CHOI, H.; BURLA, B.; KRETZSCHMAR, T.; LEE, Y.; MARTINOIA, E. **Plant ABC transporters**. Arabidopsis Book, 1 Ed, Rockville: American Society of Plant Biologists, 2011.

KASPARY, Tiago Edu. **Caracterização biológica e fisiológica de buva (*Conyza bonariensis* L.) resistente ao herbicida glyphosate.** 2014. 102f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Agricultura e Ambiente. Universidade Federal de Santa Maria, Frederico Westphalen- RS, 2014.

KAUDUM, S. S.; ZELAYA, I. A.; DALE, R. P.; LYCETT, A. J.; CARTER, P. 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.637-646, 2008.

KISHORE, G. M.; SHAD, D. M. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. **Annual Review of Biochemistry**, v.57, n. 7, p.27-663, 1988.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas.** Tomo II. 2.ed. São Paulo: Basf Brasileira, 1999.

KISSMANN, K. G. **Plantas infestantes e nocivas.** TOMO I. 3ª Ed. São Paulo: Basf Brasileira S. A., 2003.

KLEIN, M.; MARTINOIA, E.; HOFFMANN-THOMA, G.; WEISSENBOCK, G. A membrane-potential dependent *ABC-like transporter* mediates the vacuolar uptake of rye flavone glucuronides: regulation of glucuronide uptake by glutathione and its conjugates. **Plant Journal**, v.21, n. 3, p.289-304, 2000.

KLEIN, M.; BURLA, B.; MARTINOIA, E. The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants. **FEBS Letters**, v.580, n. 4, p.1112-1122, 2006.

KOGER, C. H.; REDDY, K. N. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). **Weed Science**, v.53, n. 1, p.84-89, 2005.

KRAEHMER, H.; BAUR, P. **Weed anatomy.** Frankfurt, Germany: British Library, 2013.

KRUEZ, K.; TOMMASINI, R.; MARTINOIA, E. Old enzymes for a new job. **Plant Physiology**, v.111, n. 2, p.349-353, 1996.

LAZAROTO, C. A.; FLECK, N. G.; VIDAL, R. A. Biologia e ecofisiologia de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*). **Ciência Rural**, v.38, n. 3, p.852-860, 2008.

LOPEZ-OVEJERO, R. F.; TAKANO, H. K.; NICOLAI, M.; FERREIRA, A.; MELO, M. S. C.; CAVENAGHI, A. L.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; OLIVEIRA JR, R. S. Frequency and dispersal of glyphosate-resistant sourgrass (*Digitaria insularis*) populations across Brazilian agricultural production areas. **Weed Science**, v.65, n. 2, p.285-294, 2017.

MAROCHIO, C. A.; BEVILAQUA, M. R. R.; TAKANO, H. K.; MANGOLIM, C. A.; OLIVEIRA JR, R. S.; MACHADO, M. F. P. S. Genetic admixture in species of *Conyza* (Asteraceae) as revealed by microsatellite markers. **Acta Scientiarum**, v.39, n. 4, p.437-445, 2017.

MAXWELL, B. D.; MORTIMER, A. M. Selection for herbicide resistance. In: POWLES, S. B e HOLTUM, J. A. M. (Ed.). **Herbicide resistance in plants: biology and biology and biochemistry**. 1. Ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 1994, p. 1-25.

MENKSEN, K.; KAHL, G. **Handbook of plant genome mapping**. 1. Ed. Weinheim: Wiley, 2005.

MICHAEL, P. J.; OWEN, M. J.; POWLES, S. B. Herbicide-resistant weed seeds contaminate grain sown in the Western Australian grainbelt. **Weed Science**, v.58, n. 4, p.466-472, 2010.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v.88, n. 21, p.9828-9832, 1991.

MOREIRA, M.; MELO, M. S. C.; CARVALHO, S. J. P.; NICOLAI, M.; CRHISTOFFOLETI, P. J. Herbicidas alternativos para controle de biótipos de *Conyza bonariensis* e *C. canadensis* resistentes ao glyphosate. **Planta Daninha**, v.28, n. 1, p.167-175, 2010.

MUELLER, T. C.; MITCHELL, P. D.; YOUNG, B. G.; CULPEPPER, A. S. Proactive versus reactive management of glyphosate-resistant or – tolerant weeds. **Weed Technology**, v.19, n. 4, p.924-933, 2005.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.70, n. 12, p.3321-3323, 1973.

NOHATTO, Marcos André. **Resposta de *Euphorbia heterophylla* proveniente de lavouras de soja Roundup Ready® do Rio Grande do Sul ao herbicida glyphosate.**

2010. 76f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

OKADA, M.; HANSON, B. D.; HEMBREE, K. J.; PENG, Y.; SHRESTHA, A.; STEWART, C. N.; WRIGHT, S. D.; JASIENIUK, M. Evolution and spread of glyphosate resistance in *Conyza canadensis* in California. **Evolutionary Applications**, v.6, n. 5, p.761-777, 2013.

OKADA, M.; HANSON, B. D.; HEMBREE, K. J.; PENG, Y.; SHRESTHA, A.; STEWART, C. N.; WRIGHT, S. D.; JASIENIUK, M. Evolution and spread of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* in California and a comparison with closely related *Conyza Canadensis*. **Weed Research**, v.55, n. 2, p.173-184, 2014.

OLIVEIRA NETO, A. M.; CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA JR, R. S.; GUERRA, N.; DAN, H. A.; ALONSO, D. G.; BLAINSKI, E.; SANTOS, G. Estratégias de manejo de inverno e verão visando ao controle de *Conyza bonariensis* e *Bidens pilosa*. **Planta Daninha**, v.28, p.1107-1116, 2010. Número especial.

OWEN, M. D. K. Weed species shifts in glyphosate-resistant crops. **Pest Management Science**, v.64, n. 4, p.377-387, 2008.

OWEN, M. J.; POWLES, S. B. Glyphosate-resistant rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) populations in the Western Australian grain belt. **Weed Technology**, v.24, n. 1, p.44-49, 2010.

OWEN, M. J.; MARTINEZ, N. J.; POWLES, S. B. Multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* (annual ryegrass) now dominates across the Western Australian grain belt. **Weed Research**, v.54, n. 3, p.314-324, 2014.

PATEL, F.; TREZZI, M. M.; MIOTTO JR, E.; DEBASTIANI, F.; MOSQUEM, R. Redução de rendimento de grãos de soja devido a variação em densidades e períodos de introdução da buva (*Conyza bonariensis*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27, Ribeirão Preto, 2010. **Resumos...** Ribeirão Preto: Funep, 2010. P.1674-1677.

PENG, Y.; ABERCROMBIE, L. L. G.; YUAN, J. S.; RIGGINS, C. W.; SAMMONS, R. D.; TRANEL, P. J.; STEWART JR, C. N. Characterization of the horseweed (*Conyza canadensis*) transcriptome using GS-FLX 454 pyrosequencing and its application for expression analysis of candidate non-target herbicide resistance genes. **Pest Management Science**, v.66, n. 10, p.1053-1062, 2010.

POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review Plant Biology**, v.61, n. -, p.317-347, 2010.

PRUSKI, J. F.; SANCHO, G. *Conyza sumatrensis* var. *leiotheca* (Compositae: Asteraceae), a new combination for a common neotropical weed. **Novon**, v.16, n. 1, p.96-101, 2006.

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

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

REN, M. X.; LI, X. Q.; DING, J. Q. Genetic variation and spread pattern of invasive *Conyza sumatrensis* around China's Three Gorges Dam. **Acta Oecologica**, v.36, n. 6, p.599-603, 2010.

ROULEAU, E.; LAMOUREUX, G. **Atlas of the vascular plants of the island of New foundland and of the islands of Saint-Pierre-et-Miquelon**. 1. Ed. Quebec: Groupe Fleurbec, 1992.

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

SANTOS, F. M.; VARGAS, L.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; AGOSTINETTO, D.; MARTIN, T. N.; RUCHEL, Q.; FERNANDO, J. A. 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, F. M.; VARGAS, L.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; MARTIN, T. N.; MARIANI, F.; SILVA, D. R. O. Herbicidas alternativos para o controle de *Conyza sumatrensis* (Retz.) E. H. Walker resistentes aos inibidores da ALS e EPSPs. **REVISTA CERES**, v.62, n. 6, p.531-538, 2015.

SATICHIVI, N. M.; WAX, L. M.; STOLLER, E. W.; BRISKIN, D. P. 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.

SINGH, S.; SINGH, M. Effect of growth stage on trifloxysulfuron and glyphosate efficacy in twelve weed species of citrus groves. **Weed Technology**, v.18, n. 4, p.1031-1036, 2004.

SHANER, D. L. The impact of glyphosate-tolerant crops on the use of other herbicides and on resistance management. **Pest Management Science**, v.56, n. 4, p.320-326, 2000.

SHANER, D. L. Lessons learned from the history of herbicide resistance. **Weed Science**, v.62, n. 2, p.427-431, 2014.

SHANER, D. L. **Herbicide Handbook**. Weed Science Society of America, Lawrence, 13. Ed. Lawrence: Weed Science Society of America, 2014.

SHRESTHA, A.; HEMBREE, K. J.; VA, N. Growth stage influences level of resistance in glyphosate-resistant horseweed. **California Agriculture**, v.61, n. 2, p.67-70, 2007.

SOKAL, R. R.; MICHENER, C. D. A statistical method for evaluating systematic relationships. **The University of Kansas Scientific Bulletin**, v.28, n. 8, p.1409-1438, 1958.

TANI, E.; CHACHALIS, D.; TRAVLOS, I. S. A glyphosate resistance mechanism in *Conyza canadensis* involves synchronization of EPSPS and ABC-transporters. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.33, n. 6, p.1721-1730, 2015.

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

THEBAUD, C.; FINZI, A. C.; AFFRE, L.; DEBUSSCHE, M.; ESCARRE, J. Assessing why two introduced *Conyza* differ in their ability to invade Mediterranean old fields. **Ecology**, v.77, n. 3, p.791-804, 1996.

THEISEN, G.; RUEDELL, J. **Tecnologia de Aplicação de Herbicidas. Teoria e Prática**. 1. Ed. Cruz Alta: Aldeia Norte, 2004.

TREZZI, M. M.; BALBINOT JR, A. A.; BENIN, G.; DEBASTIANI, F.; PATEL, F.; MIOTTO JR, E. Competitive ability of soybean cultivars with horseweed (*Conyza bonariensis*). **Planta Daninha**, v.31, n. 3, p.543-550, 2013.

ULGUIM, André da Rosa. **Resposta de capim pé-de-galinha (*Eleusine spp.*) ao herbicida glyphosate**. 2012. 71f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

USDA - United States Department of Agriculture. **Selected weeds of the United States**. Washington: Agriculture Research Service, 1970. 463p. (Agriculture Handbook, n.366).

USUI, K. Metabolism and selectivity of rice herbicides in plants. **Weed Biology**, v.1, n. 3, p.137-146, 2001.

VANGESSEL, M. J.; SCOOT, B. A.; JOHNSON, Q. R.; WHITE-HANSEN, S. Influence of glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) growth stage on response to glyphosate applications. **Weed Technology**, v.23, n. 1, p.49-53, 2009.

VARGAS, L.; BIANCHI, M. A.; RIZZARDI, M. A.; AGOSTINETTO, D.; DAL MAGRO. Buva (*Conyza bonariensis*) resistente ao glyphosate na região sul do Brasil. **Planta Daninha**, v.25, n. 3, p.573-578, 2007.

VARGAS, L.; SILVA, A. A. da.; AGOSTINETTO, D.; GAZZIERO, D. Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas. In: AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. (Eds.) **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Passo Fundo: Berthier, 2009.

VARGAS, L.; GAZZIERO, D. **Seleção de plantas daninhas tolerantes e resistentes ao glyphosate**. Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/downloads/GlifosatoeselecaopeciesCongressomilho.PDF>>. Acesso em: 10 dez. 2009.

VARGAS, L.; NOHATTO, M. A.; AGOSTINETTO, D.; BIANCHI, M. A.; GONÇALVES, E. M.; TOLEDO, R. E. Resposta de biótipos de *Euphorbia heterophylla* a doses de glyphosate. **Planta Daninha**, v.29, p.1121-1128, 2011. Número especial.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends Biotechnology**, v.23, n. 1, p. 48-55, 2005.

VELINI, E.D.; MESCHEDÉ, D.K.; CARBONARI, C.A.; TRINDADE, M.L.B. **Glyphosate**. Botucatu: FEPAF, 2009.

VERLDHUIS, L. J.; HALL, L. M.; O'DONOVAN, J. T.; DYER, W.; HALL, J. C. Metabolism-based resistance of a wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) biotype to ethametsulfuron-methyl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n. 7, p.2986-2990, 2000.

VERRIER, P. J.; BIRD, D.; BURLA, B.; DASSA, E.; FORESTIER, C.; GEISLER, M. Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory. **Trends in Plant Science**, v.13, n. 4, p.151-159, 2008.

VIDAL, R. A.; MERROTO JR., A. **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 2001.

VILA-AIUB, M. M.; BALBI, M. C.; DISTEFANO, A. J.; FERNANDEZ, L.; HOPP, E.; YU, Q.; POWLES, S. B. Glyphosate resistance in perennial *Sorghum halepense*

(Johnsongrass), endowed by reduced glyphosate translocation and leaf uptake. **Pest Management Science**, v.68, n. 3, p.430-436, 2012.

WANG, X.; TRIGIANO, R. N.; STEWART, N. C.; WADL, P. A.; GOOD, L. L.; SCHEFFLER, B. E.; RINEHART, T. A. Microsatellites from *Conyza canadensis* (horseweed). **Entomology and Plant Pathology**, University of Tennessee, USA, 2008.

WHITTON, J.; RIESEBERG, L. H.; UNGERER, M. C. Microsatellite loci are not conserved across the asteraceae. **Molecular Biology Evolutionary**, v.14, n. 2, p.204-209, 1997.

WU, H.; WALKER, S. **Fleabane: Fleabane biology and control. 2004**. Disponível em <http://www.weeds.crc.org.au/documents/fleabane.pdf>. Acesso em 23 de agosto de 2015.

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.

YU, Q.; COLLAVO, A.; ZHENG, M. Q.; OWEN, M.; SATTIN, M.; POWLES, S. B. Diversity of acetyl-coenzyme A carboxylase mutations in resistant *Lolium* populations: evaluation using clethodim. **Plant Physiology**, v.145, n. -, p.547-558, 2007.

YU, Q.; HUANG, S.; POWLES, S. B. Direct measurement of paraquat in leaf protoplasts indicates vacuolar paraquat sequestration as a resistance mechanism in *Lolium rigidum*. **Pesticide, Biochemistry and Physiology**, v.98, n. 1, p.104-109, 2010.

YUAN, J. S.; TRANEL, P. J.; STEWART, C. N. Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends in Plant Science**, v.12, n. 1, p.6-13, 2007.

ZHANG, D.; ZHANG, H.; WANG, M.; SUN, J.; QI, Y.; WANG, F.; WEI, X.; HAN, L.; WANG, X.; LI, Z. Genetic structure and differentiation of *Oryza sativa* L. in China revealed by microsatellites. **Theory Applied Genetic**, v.119, n. 6, p.1105-1117, 2009.



PPGAgro

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV