

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização fisiológica, enzimática e molecular dos mecanismos
de resistência da planta daninha *Conyza bonariensis* ao herbicida
glyphosate e alternativas de controle**

Vanessa Camponez do Brasil Cardinali

**Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fitotecnia**

**Piracicaba
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Vanessa Camponez do Brasil Cardinali
Engenheiro Agrônomo**

**Caracterização fisiológica, enzimática e molecular dos mecanismos de resistência
da planta daninha *Conyza bonariensis* ao herbicida glyphosate
e alternativas de controle**

**Orientador:
Prof. Dr. PEDRO JACOB CHRISTOFFOLETI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba
2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Cardinali, Vanessa Camponez do Brasil

Caracterização fisiológica, enzimática e molecular dos mecanismos de resistência da planta daninha *Conyza bonariensis* ao herbicida glyphosate e alternativas de controle / Vanessa Camponez do Brasil Cardinali. - Piracicaba, 2009.
91 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Expressão gênica 2. Herbicidas - Resistência 3. Plantas daninhas 4. Reação em cadeia por polimerase I. Título

CDD 632.58
C267c

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

A DEUS pela força e tranqüilidade concedida nos momentos difíceis e por tornar possível o meu tão sonhado título de mestre

OFEREÇO

Aos meus pais Antonio (*in memoriam*) e Hebe, pelo amor, incentivo e lição de vida.

Aos meus irmãos Livia e Marcelo pela amizade, paciência, e companheirismo.

Aos meus avós Lourdes e Moacyr pelo estímulo e carinho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos de que alguma forma contribuíram com este trabalho, em especial:

- À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, em especial ao Departamento de Produção Vegetal;

- Ao Prof. Dr. Pedro Jacob Christoffoleti pela orientação, confiança, estímulo, exemplo, amizade, oportunidade e valiosas contribuições científicas durante todo o curso.

- Ao Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo pelos ensinamentos, sugestões, prontidão e amizade.

- Ao Prof. Dr. C. Neal Stewart e Prof. Dr. Thomas C. Mueller pela oportunidade, colaboração, paciência e ensinamentos;

- Ao Prof. Dr. Antonio Figueira e Felipe Campana pela colaboração nos ensaios de biologia molecular;

- À MONSANTO do Brasil pelo suporte financeiro;

- À CAMBUHY Agrícola por ceder gentilmente o material vegetal e a área para a condução dos experimentos de campo.

- À BIOAGRI Laboratórios Ltda e ao Laboratório de Ecotoxicologia do CENA/USP pela disponibilização dos equipamentos para análise de absorção e translocação e pela oportunidade;

- À Luciane, secretária do Programa de Pós Graduação em Fitotecnia da ESALQ/USP, pela ajuda durante o curso;

- À minha amiga e companheira de mestrado MSc. Ana Carolina Ribeiro Dias por todo o auxílio na condução dos experimentos e principalmente pela amizade e apoio durante o curso;

- Aos demais companheiros de pós-graduação esalqueanos: MSc. Murilo S. Moreira (Kuzinha), Dr. Marcelo Nicolai (Ruço), Daniela Ribeiro (Nevask) e MSc. Saul J. Carvalho (H-Romeu) pela amizade e pelos conhecimentos transmitidos;

- A todos os amigos que me acompanharam durante o mestrado, em especial: MSc. Livia Marcolini, Dr. Guy Tsumanuma (Magú), Nathália B. Rodrigues, Dr. Robson R. M. Barizon, MSc. João Luis Carvalho e MSc. Maisa H. Belizario pelo estímulo, paciência e amizade.

A todos vocês meu MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
Referências	14
2 ACÚMULO DE SHIQUIMATO EM BIÓTIPOS SUSCETÍVEIS E RESISTENTES DE BUVA (<i>Conyza bonariensis</i>) PARA DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA AO HERBICIDA GLYPHOSATE.....	17
Resumo	17
Abstract	18
2.1 Introdução	18
2.2 Material e Métodos	22
2.3 Resultados e Discussão	24
2.4 Conclusões.....	28
Referências	28
3 ABSORÇÃO FOLIAR E TRANSLOCAÇÃO DO HERBICIDA GLYPHOSATE EM PLANTAS RESISTENTE E SUSCETÍVEL DE BUVA (<i>Conyza bonariensis</i> (L.) Cronquist.) A ESTE HERBICIDA.....	31
Resumo	31
Abstract	31
3.1 Introdução	32
3.2 Material e Métodos	35
3.3 Resultados e Discussão	37
3.4 Conclusões.....	42
Referências	42
4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GENICA DA EPSPS EM <i>Conyza bonariensis</i> RESISTENTE AO GLYPHOSATE	45
Resumo	45
Abstract	45

4.1 Introdução.....	46
4.2 Material e Métodos	48
4.3 Resultados e Discussão	52
4.4 Conclusões	63
Referências.....	63
5 ALTERNATIVAS DE CONTROLE DE <i>Conyza bonariensis</i> e <i>C. canadensis</i> RESISTENTES AO GLYPHOSATE EM POMARES CÍTRICOS	67
Resumo	67
Abstract.....	67
5.1 Introdução.....	68
5.2 Material e Métodos	70
5.3 Resultados e Discussão	71
5.4 Conclusão	75
Referências.....	75
6 CONCLUSÕES GERAIS	77
ANEXOS.....	79

RESUMO

Caracterização fisiológica, enzimática e molecular dos mecanismos de resistência da planta daninha *Conyza bonariensis* ao herbicida glyphosate e alternativas de controle

A utilização ampla do glyphosate como herbicida na agricultura brasileira e mundial é conseqüência, dentre outros fatores, de seu custo relativamente baixo, alta eficácia no controle de plantas daninhas, amplo espectro de controle de espécies de plantas daninhas, baixa toxicidade, e curta persistência no ambiente. No entanto, o uso intensivo do glyphosate tem proporcionado a seleção de biótipos de plantas daninhas resistentes a este herbicida, como é o caso da buva (*Conyza bonariensis*). Apesar de estudos já terem sido conduzidos pela comunidade científica de diversos países, para elucidar o fenômeno sob diversos aspectos, no Brasil são poucos os estudos científicos que esclareçam os mecanismos de resistência de plantas daninhas ao glyphosate. Neste sentido, esta pesquisa teve por objetivo estudar comparativamente populações resistentes (R) e suscetíveis (S) de *C. bonariensis* ao herbicida glyphosate para caracterizar o nível de resistência das populações R; comparar os níveis de acúmulo de ácido shiquímico entre as populações R e S; elucidar os principais mecanismos de resistência dos biótipos R, através da análise da absorção e translocação do herbicida, determinar a expressão gênica da EPSPS, através de análises semi-quantitativas RT-PCR e sugerir alternativas químicas de controle para buva em pomares cítricos do Estado de São Paulo. Os resultados obtidos através do estudo de ácido shiquímico indicaram que o mecanismo de resistência das populações R buva estudadas não está relacionado com insensibilidade da EPSPS ao glyphosate. Já os estudos de translocação diferencial evidenciaram ser esta uma das causas dos mecanismos envolvidos na resistência do biótipo R. Através da análise da expressão gênica observou-se alto grau de similaridade entre seqüências obtidas dos genes EPSPS de *C. bonariensis* e as seqüências de *C. canadensis* depositadas no GenBank. Além disso, é possível sugerir que há relação entre a expressão dos genes EPSPS em *C. bonariensis* e a condição de resistência à ação do herbicida glyphosate em alguns indivíduos dessa espécie de planta daninha.

Palavras-chave: Buva; EPSPS; Biótipos; Ácido shiquímico; PCR

ABSTRACT

Physiologic, enzymatic and molecular characterization of resistance mechanisms of the weed *Conyza bonariensis* to herbicide glyphosate and alternatives of control

The extensive use of glyphosate as herbicide in the Brazilian and worldwide agriculture is a consequence, among other factors, of the relatively low cost, high weed control efficacy; wide weed species control spectrum; low toxicity, and short persistence in the environment. However, the intensive use of glyphosate has imposed the selection of certain resistant weed biotypes to this herbicide, such as the case of the weed *Conyza bonariensis*. Despite the fact that some studies has been developed in some countries around the world, in order to elucidate the phenomenon in several aspects, in Brazil a few studies have been conducted scientifically in order to elucidate the mechanisms of weed resistance to glyphosate. Therefore, this research was developed with the objective of studying the populations of *C. bonariensis* to characterize the resistance level of populations to glyphosate; compare the levels of shikimic acid accumulation between resistant (R) and susceptible (S) plants; elucidate the main mechanisms of resistance of resistant biotypes to glyphosate, by the absorption and translocation of the herbicide, and determine the EPSPS gene expression, by the RT-PCR semi-quantitative analysis. The results obtained by the shikimic acid study indicated that the mechanism of resistance of the biotype of *C. bonariensis* studied is not related with insensitivity of the EPSPS to glyphosate. On the other hand, the differential translocation maybe considered as one of the mechanisms involved in the resistance of the biotype R of *C. bonariensis*. With regards to gene expression, it was observed high degree of similarity among the sequences obtained of the EPSPS gene of *C. canadensis*, and the sequences of *C. canadensis* deposited in the GenBank. Furthermore, it is possible to suggest that there is relation between the gene expression in *C. bonariensis* and the resistance condition to the action of the herbicide glyphosate in some individuals of this weed specie.

Keywords: Marestalk; EPSPS; Biotypes; Shikimic acid, PCR

1 INTRODUÇÃO

A *Conyza bonariensis* (buva) é uma planta de ciclo anual, originária dos Estados Unidos da América do Norte (STUBBENDIEK et al., 1995), que apresenta disseminação pelo vento e capacidade de se estabelecer em condições ambientais distintas (FERNALD 1950; BHOWMIK; BEKECH, 1993). Primeiramente, estas plantas eram problemas em áreas abandonadas como, acostamento de estradas, carreadores e áreas sem prática agrícola. Entretanto, a redução das práticas convencionais de plantio e a adoção dos sistemas conservacionistas de solo nas últimas três décadas, principalmente o sistema de semeadura direta, contribuiu para a infestação destas espécies em áreas agrícolas (KAPUSTA, 1979; REGEHR; BAZZAZ, 1979; BUHLER; OWEN, 1997; WEAVER et al., 2001).

A utilização repetitiva do glyphosate em áreas de culturas transgênicas resistentes a este herbicida bem como em áreas não agricultáveis, tem resultado no aparecimento de biótipos de buva resistentes ao produto. Embora os primeiros casos de buva resistente ao glyphosate tenham ocorrido há cerca de seis anos, o mecanismo de resistência que ocorrem nestas manifestações ainda não foram bem esclarecidos. Alguns trabalhos foram realizados com o intuito de identificar o mecanismo de resistência de buva ao glyphosate, contudo os resultados são pouco esclarecedores e ainda não há consenso sobre qual o mecanismo de resistência envolvido.

Alguns estudos relatam a existência de diferenças na adaptabilidade ecológica de biótipos resistentes de plantas daninhas. Segundo Radosevich et al. (1997), a adaptabilidade ecológica de um biótipo é tido como o sucesso de um fenótipo baseado em sua sobrevivência e seu sucesso reprodutivo. A adaptabilidade ecológica tem sido identificada como um fator importante influenciando a evolução e dinâmica da resistência a herbicidas (MAXWELL et al., 1990; LAZAROTO; FLECK, VIDAL, 2008).

Trabalhos apontam a limitação na translocação em biótipos resistentes como sendo um dos principais mecanismos envolvidos na resistência de buva ao glyphosate. De acordo com os trabalhos realizados por Feng et al. 2004; Koger e Reddy; 2005, as plantas resistentes apresentam dificuldade de exportar o glyphosate para as outras partes da planta, o que não é observado em plantas suscetíveis. Dinelli et al (2006) estudaram os possíveis mecanismos envolvidos na resistência de *Conyza canadensis*

ao glyphosate, e observaram que nos biótipos resistentes houve uma maior translocação do herbicida em direção as folhas, ao contrário da população suscetível, onde a maior concentração do herbicida translocou para as raízes. O mesmo foi observado por Lorraine-Colwill et al. (2002) em populações de *Lolium rigidum* suscetíveis e resistentes ao glyphosate.

Outro mecanismo que pode estar envolvido é a super expressão do gene que codifica a EPSPS. Em experimento realizado por Dinelli et al. 2006, os autores observaram que houve uma super expressão do gene EPSPS nos biótipos resistentes em relação aos suscetíveis. Mueller et al. (2003) quantificaram o nível de ácido shiquímico produzido por plantas resistentes e suscetíveis e sugeriram além da super-expressão do gene da EPSPS em plantas resistentes a possibilidade de existir isômeros da enzima 5-enol-piruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) as quais possuiriam menos afinidade pela molécula de glyphosate, conferindo o caráter de resistência às plantas.

Apesar de serem encontrados trabalhos na literatura, observa-se que o mecanismo de resistência de buva ao glyphosate ainda não foi totalmente elucidado. Portanto, esta pesquisa teve por objetivo estudar comparativamente populações resistentes (R) e suscetíveis (S) de *C. bonariensis* ao herbicida glyphosate para comparar os níveis de acúmulo de ácido shiquímico entre as populações R e S; elucidar os principais mecanismos de resistência dos biótipos R, através da análise da absorção e translocação do herbicida, determinar a expressão gênica da EPSPS, através de análises semi-quantitativas RT-PCR, e sugerir alternativas químicas de controle para buva em pomares cítricos do Estado de São Paulo.

Referências

- BHOWMIK, P.C.; BEKECH, M.M. Horseweed (*Conyza canadensis*) seed production, emergence and distribution in no-tillage and conventional-tillage corn (*Zea mays*). **Agronomy**, Madison, v. 1, p. 67-71, 1993.
- BUHLER, D.D.; OWEN, M.D.K. Emergence and survival of horseweed (*Conyza canadensis*), **Weed Science**, Lawrence, v. 45, p. 98–101, 1997.

- DINELLI, G.; MAROTTI, I.; BONETTI, A.; MINELLI, M.; CATIZONE, P.; BARNES, J. Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 86, n. 1, p. 30–41, 2006.
- FENG, P.C.C.; TRAN, M.; CHIU, T.; SAMMONS, R.D.; HECK, G.R.; CAJACOB, C.A. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation and metabolism. **Weed Science**, Lawrence, v. 52, n. 4, p. 498–505, 2004.
- FERNALD, M.L. In: FERNALD, M.L. (Ed.). **Gray's manual of botany**. 8th ed. New York: American Book, 1950. 1447 p.
- KAPUSTA, G.A. Seedbed tillage and herbicide influence on soybean (*Glycine max*). **Weed Science**, Lawrence, v. 27, p. 520-526, 1979
- KOGER, C.H.; REDDY, K.N. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). **Weed Science**, Lawrence, v. 53, n. 1, p. 84–89, 2005.
- LAZAROTO, C.A.; FLECK, N.G.; VIDAL, R.A. Biologia e ecofisiologia de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 852-860, 2008.
- MAXWELL, B.D.; MORTIMER, A.M. Selection for herbicide resistance. In: POWLES, S.B.; HOLTUR, J.A.M. **Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry**. Boca Raton: Lewis, 1994. p. 1-26.
- MUELLER, T.C.; MASSEY, J.H.; HAYES, R.M.; MAIN, C.L.; STEWART, C.N. JR. Shikimate accumulation in both glyphosate-sensitive and glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 51, n. 3, p. 680–684, 2003.
- RADOSEVICH, S.R.; HOLT, J.S.; GHERSA, C. Genetics and evolution of weeds. In: J. Wiley & Sons. **Weed ecology: Implications for Management**. 2nd ed. New York: 1997. p. 69–102.
- REGEHR, D.L.; BAZZAZZ, F.A. The population dynamics of *Erigeron canadensis*, a successional winter annual. **Journal of Ecology**, Oxford v. 67, p. 923-933, 1997.
- STUBBENDIECK, J.; FRIISOE, G.Y.; BOLICK, M.R. **Weeds of Nebraska and the great plains**. Lincoln: Nebraska Department of Agriculture, 1995, p.122-123.
- WEAVER, S.E. The biology of Canadian weeds, *Conyza canadensis*. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 81, n. 5, p. 867-875, 2001.

2 ACÚMULO DE SHIQUIMATO EM BIÓTIPOS SUSCETÍVEIS E RESISTENTES DE BUVA (*Conyza bonariensis*) PARA DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA AO HERBICIDA GLYPHOSATE

Resumo

A intensa utilização do herbicida glyphosate em áreas agrícolas, aliada às características biológicas da planta daninha buva (*Conyza bonariensis*) e sistemas de produção de baixa diversidade de métodos de controle de plantas daninhas tem selecionado populações de resistentes. Um indicador da intensidade da atividade do glyphosate nas plantas é a medida do acúmulo de shiquimato nas células onde o herbicida atua como consequência da inibição competitiva da reação de condensação entre o fosfo-enol piruvato e o shiquimato. Portanto, populações de plantas daninhas resistentes (R) têm como consequência um acúmulo diferencial de ácido shiquímico, quando comparadas com plantas suscetíveis (S). Sendo assim, este trabalho foi desenvolvido com os objetivos de (1) desenvolver um procedimento analítico para determinar quantitativamente o shiquimato em plantas R e S de buva após a aplicação de glyphosate; (2) confirmar resistência ao glyphosate de uma população suspeita de *C. bonariensis*; (3) especular sobre os possíveis mecanismos de resistência ao glyphosate deste biótipo. Para isso, plantas de buva contendo nove folhas verdadeiras foram submetidas a uma aplicação de glyphosate na dose equivalente a dose máxima recomendada para o controle de buva (720 g e.a. ha⁻¹). A coleta da parte aérea das plantas foi feita 2, 3, 4, 7 e 10 dias após o tratamento (DAT) com o herbicida. Nos mesmos tempos de coleta também foram amostradas plantas não submetidas à aplicação as quais serviram como testemunha. A extração do ácido shiquímico das folhas foi feita através de HCl 1,0 mol L⁻¹, sendo o extrato submetido à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os resultados evidenciaram que o acúmulo de ácido shiquímico foi significativamente maior no biótipo S em comparação ao R. Dez dias após a aplicação 100% das plantas S morreram enquanto que as plantas R apresentaram apenas injúrias nas folhas não suficientes para ocasionar a mortalidade da planta, provando assim ser uma metodologia adequada para comprovação da resistência de plantas de *C. bonariensis* ao herbicida glyphosate. A conclusão geral sobre a presente pesquisa é que o procedimento de isolamento e quantificação do ácido shiquímico à partir de plantas intactas tratadas com glyphosate é adequado para diferenciação de plantas R de plantas S de buva ao glyphosate. A população R suspeita utilizada nesta pesquisa foi confirmada como resistente ao glyphosate. Apesar de especulativo, através de evidências indiretas, o mecanismo de resistência do biótipo de buva estudado não está relacionado com insensibilidade da EPSPS ao glyphosate.

Palavras-chave: *Conyza bonariensis*; CLAE; EPSPS; Seleção

Abstract

The intensive application of the herbicide glyphosate in agricultural areas, as well as the biological characteristics of the weed *C. bonariensis* and the low diversity of the weed control methods have selected resistant populations. An indicator of the glyphosate activity in plants is the measurement of the shikimate accumulation in the cell where the herbicide works as consequence of the competitive inhibition of condensation reaction between phospho-enol-pyruvate and shikimate. Therefore, resistant weed plants (R) have as consequence a differential accumulation of shikimic acid, when compared to the susceptible plants (S). So, this work was developed with objectives of: (1) developing an analytical procedure to determine quantitatively the shikimate in R and S plants of *C. bonariensis* after glyphosate application; (2) confirming the resistance to glyphosate of a suspected population of *C. bonariensis* and; (3) speculating about the possible mechanism of glyphosate resistance of this biotype. For that, *C. bonariensis* plants at the phenological stage of nine true leaves were submitted to a glyphosate application of the equivalent recommended rate of *C. bonariensis* control ($720 \text{ g a.e.ha}^{-1}$). The shoots of the plants were collected at 2, 3, 4, 7 and 10 days after the herbicide treatment (DAA). At the same time it was also sampled plants that were not submitted to application as check. The shikimic acid extraction of the leaves was done by $\text{HCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$, being the extract submitted to a high liquid performance chromatography (HPLC). The results showed that the accumulation of shikimic acid was significantly higher in the S biotype in comparison to the R biotype. Ten days after the application 100% of the S plants were dead while the R plants only some injury in the leaves, not enough to cause the mortality of the plant, confirming that the methodology is feasible for confirming cases of resistance of *C. bonariensis* to glyphosate. The general conclusion of the present research is that the isolation procedure and quantification of the shikimic acid from intact plants treated with glyphosate is adequate for differentiation of R and S plants of *C. bonariensis* to glyphosate. The suspected R population used in this research was confirmed as resistant to glyphosate. Even though it is speculative, by the indirect evidences, the mechanism of resistance of the *C. bonariensis* studied is not related to insensitivity of EPSPS to glyphosate.

Keywords: *Conyza bonariensis*; HPLC; EPSPS; Selection

2.1 Introdução

A buva (*Conyza bonariensis*) é uma planta daninha originária da América do Sul, de ocorrência no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai. Esta espécie destaca-se por infestar áreas abandonadas, pastagens, culturas anuais e perenes. Trata-se de uma planta anual, que se reproduz por sementes, as quais germinam com maior intensidade no final do outono e inverno, encerrando seu ciclo na primavera ou verão (KISSMANN;

GROTH, 1999). No Brasil, geralmente germina em outubro e produz sementes em meados de janeiro, mas dependendo das condições climáticas podem germinar o ano todo (MOREIRA, 2008; VIDAL et al., 2007). Por apresentar propagação apenas por sementes, as plantas apresentam adaptações nos aquênios denominadas de *papus*, que possibilitam a disseminação das sementes pelo vento a longas distâncias. Além disso, as plantas do gênero *Conyza* possuem grande adaptabilidade às condições climáticas e por isso apresentam ampla distribuição geográfica. Apesar disso, não representam problemas em áreas manejadas sob sistema convencional de cultivo (BROWN; WHITWELL, 1988) já que o revolvimento do solo limita a infestação.

Com a intensificação do uso do glyphosate principalmente em decorrência das culturas transgênicas, o surgimento de plantas daninhas resistentes vem se tornando mais freqüente (CHRISTOFFOLETI et al., 2008). O primeiro relato de resistência de *Conyza bonariensis* a glyphosate ocorreu em 2003 e atualmente já foram comprovados casos de resistência na África do Sul, Espanha, Brasil, Colômbia e Estados Unidos (HEAP, 2008). Recentemente, Vargas et al. (2007) observaram baixa resposta de um biótipo de *C. bonariensis* considerado resistente ao glyphosate quando submetido à altas doses do herbicida. O mesmo foi observado por Moreira et al. (2007) em um pomar de citros no Estado de São Paulo.

O glyphosate atua bloqueando o ciclo do ácido shiquímico, ou seja, competindo pelo mesmo sítio de ação da 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintetase (EPSPs), promovendo deste modo diminuição na síntese de 5-enol-piruvil-shiquimato-3-fosfato. O ciclo do ácido shiquímico só ocorre em plantas, fungos e bactérias, e caracteriza-se por ser responsável pela produção de aminoácidos aromáticos e compostos secundários como alcalóides, cumarinas, flavonóides e compostos fenólicos (PADGETTE et al., 1995; ARNAUD et al., 1994). Portanto, plantas suscetíveis ao herbicida morrem em decorrência da falta dos aminoácidos essenciais e tem como consequência o acúmulo de ácido shiquímico. Por outro lado, as plantas resistentes ao glyphosate se diferem das suscetíveis por não acumularem ácido shiquímico. Pline et al. (2002) avaliaram o acúmulo de ácido shiquímico em plantas de algodão resistentes e suscetíveis ao glyphosate e verificaram que todos os tecidos das plantas suscetíveis apresentaram

acúmulo de ácido shiquímico em decorrência do uso do glyphosate, ao contrário das plantas resistentes que acumularam muito menos.

A seleção de biótipos de plantas daninhas resistentes ao glyphosate preocupa muitos produtores agrícolas, pesquisadores e pessoas envolvidas com a recomendação e uso deste herbicida (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2008). No entanto, em alguns casos, o controle ineficiente de plantas pelo glyphosate pode ser devido a causas diversas que não resistência, tais como doses subletais, estágio de desenvolvimento da planta daninha e época de aplicação inadequada, tecnologia de aplicação ineficiente, dentre outras (KOGER; POSTON; REDDY, 2004). Desta forma, é fundamental determinar se um controle inadequado de plantas daninhas pelo glyphosate é devido a resistência ou por outros fatores. Caso a resistência seja detectada corretamente é possível adotar estratégias alternativas de manejo.

Existem diversos métodos para detecção da resistência de plantas daninhas a herbicidas (BECKIE et al., 2000). Testes de campo ou casa-de-vegetação são os mais comuns de serem utilizados e proporcionam resultados confiáveis. Porém, um dos aspectos negativos destes testes é que requerem muito tempo para a obtenção do resultado final. Uma alternativa potencial para estes métodos é a utilização de testes mais simples e rápidos, utilizando partes da planta.

Vários tipos de bioensaios têm sido propostos para detectar rapidamente a resistência de plantas daninhas ao glyphosate. Um deles é a germinação em placas de Petri contendo diferentes concentrações de glyphosate e medindo o comprimento da radícula e caulículo após 4 a 8 dias do tratamento (ESCORIAL et al., 2001; PEREZ; KOGAN, 2003). Um dos grandes problemas para este tipo de bioensaio é que há necessidade de produção de sementes das plantas, que pode demandar tempo. Assim, para testar populações provenientes do campo, as sementes devem ser coletadas e a dormência quebrada antes de realizar o bioensaio, necessitando muitas vezes de muito tempo entre o processo de obtenção de sementes no campo e o teste em laboratório.

Com o objetivo de caracterizar a resistência ao glyphosate em *Lolium multiflorum* (azevém) foi desenvolvida uma pesquisa por Neves (2008) com os objetivos de: testar a efetividade de curvas de dose-resposta em placas de Petri e em vasos, verificar o acúmulo *in vivo* de ácido shiquímico, e avaliar o comportamento da fotossíntese líquida,

como metodologia de detecção da resistência ao glyphosate. A avaliação dos testes de detecção permitiu concluir que todos os testes estudados foram adequados para identificar os biótipos resistentes, sendo que a escolha do método deve estar fundamentada nos objetivos que se pretende com a avaliação.

A medida do acúmulo de ácido shiquímico em tecidos vegetais tratados com glyphosate pode ser uma alternativa para detecção rápida de populações resistentes a este herbicida. A inibição competitiva da EPSPS pelo glyphosate resulta no acúmulo de shiquimato nos tecidos afetados (BRESNAHAN et al., 2003). Shaner et al. (2005) descreveu um bioensaio *in vivo* como um método para detectar a resistência ao glyphosate. Neste bioensaio, discos foliares retirados de plantas em pleno crescimento são incubados com glyphosate na concentração de 500 μM de glyphosate, e a quantidade de shiquimato acumulado nos discos é medida com espectrofotômetro. O bioensaio pode ser utilizado para diferenciação entre culturas resistentes e suscetíveis ao glyphosate, expressando uma EPSPS insensível ao herbicida. No entanto, o bioensaio não tem sido utilizado para detectar resistência ao glyphosate em casos onde a resistência é decorrente de translocação reduzida do herbicida para as regiões de crescimento das plantas.

No bioensaio desenvolvido por Mueller et al. (2003) foi detectado também que existem diferenças nos padrões de acúmulo de shiquimato entre biótipos R e S de *C. canadensis*. As concentrações de shiquimato nas populações R declinou cerca de 40% de 2 para 4 dias após tratamento (DAA) com glyphosate, enquanto que as concentrações de shiquimato nas plantas S aumentou cerca de 35% de 2 para 4 DAA. O bioensaio foi simples e robusto, e tem potencial para ser usado na prática para detecção de plantas resistentes ao glyphosate.

Experimentos foram conduzidos por Henry, Shaner e West (2007) para avaliar a utilidade de bioensaios com disco foliares e espectrometria na detecção do acúmulo de shiquimato depois da aplicação de glyphosate nas culturas de girassol, painço e trigo. Em girassol, foi possível detectar doses de 105 e 210 g e.a ha^{-1} de glyphosate a um e quatro DAA, no entanto o nível de shiquimato nas plantas começou a diminuir e, aos 14 DAA não foi mais detectado. Os autores concluíram que bioensaio com o uso de

espectrometria é rápido e simples, e pode inclusive ser utilizado para verificar deriva de glyphosate em culturas.

Desta forma, a quantificação de ácido shiquímico em plantas submetidas a uma aplicação de glyphosate pode ser considerada como uma medida rápida e eficiente de determinar a resistência de plantas daninhas a este herbicida. Neste sentido, este trabalho teve por objetivos: (1) desenvolver um procedimento analítico para determinar quantitativamente o shiquimato em plantas R e S de *C. bonariensis* após a aplicação de glyphosate; (2) confirmar resistência ao glyphosate de uma população suspeita de *C. bonariensis*; (3) especular sobre os possíveis mecanismos de resistência ao glyphosate deste herbicida.

2.2 Material e Métodos

O experimento foi instalado em casa de vegetação do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ - USP, localizado em Piracicaba – SP (22° 42' 30" latitude sul, 47° 38' 00" longitude oeste e 546 m de altitude), entre fevereiro e março de 2008. Foram utilizadas duas populações de buva (*Conyza bonariensis*), sendo uma com suspeita de resistência oriunda de uma área de citros do município de Matão-SP (Fazenda Cambuhy), sendo que esta área tinha no mínimo 15 anos de cultivo de citrus com aplicações anuais de glyphosate, e outra suscetível, coletada em uma área sem histórico de aplicação de glyphosate no município de Piracicaba-SP. Sementes dos dois biótipos foram coletadas de plantas adultas em estágio de maturidade fisiológica das sementes, sendo estas em seguida semeadas em vasos de 15 cm de diâmetro x 12 cm de altura contendo substrato comercial do tipo Plantmax e vermiculita na proporção de 2:1, devidamente fertilizado com 200 mg de N, P₂O₅ e K₂O. Os vasos foram identificados, irrigados e, em seguida, as sementes foram depositadas na superfície e cobertas com uma camada fina de substrato. Trinta dias após a germinação das sementes, as plantas, contendo três folhas verdadeiras, foram transferidas individualmente para vasos de capacidade de 200 mL.

Quando as plantas atingiram nove folhas foi realizada aplicação de glyphosate na dose equivalente a 720 g de e.a. ha⁻¹. A aplicação do herbicida foi realizada dia 11 de

fevereiro de 2008, das 9:00 às 9:30 h. No momento das aplicações, os parâmetros meteorológicos médios foram: umidade relativa (UR) de 75%; temperatura (T) de 25,4°C; céu com ausência de nuvens e ventos de 1,5 km h⁻¹. Os tratamentos utilizados constaram de dois biótipos (suscetível - S e resistente - R), cinco tempos de coleta e quatro repetições. Nos tempos: 2, 3, 4, 7 e 10 dias após a aplicação (DAA) com o herbicida, foram feitas coletas da parte aérea da planta as quais foram conservadas em freezer a -20 °C até o processamento das análises.

Para realizar o processo de extração do ácido shiquímico, as plantas foram maceradas e homogeneizadas com o auxílio de nitrogênio (N₂) líquido. Em seguida, uma massa entre 0,5 e 1,0 g do tecido vegetal de cada amostra foi pesada e acondicionada em um frasco de vidro de capacidade de 20 mL, em seguida 15 mL de uma solução de HCl 1,0 mol.L⁻¹ foram adicionados. Posteriormente, os frascos foram agitados em uma mesa orbital durante 24 horas a 1.500 rpm. Após a agitação, os extratos foram filtrados com um filtro Whatman N° 1 e coletados em uma proveta graduada até atingir um volume de 5,0 mL. Em seguida, 250 µL de NaOH saturado e 2,5 mL de acetonitrila foram adicionados aos frascos. O extrato foi passado por um filtro de nylon de 0,45 µm acoplado a uma seringa e adicionado em frascos de cromatografia de capacidade de 2,0 mL.

A quantificação do ácido shiquímico das plantas (CROMARTIE; POLGE, 2000) foi realizada através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo Agilent 1100 (Wilmington, DE), equipado com um software "Chemstation", auto-injeção e um detector de diodo (DAD). O equipamento foi operado com uma coluna Phenomenex Luna NH₂ 100A (250 mm x 4,6 mm x 5,0 µm) e o monitoramento dos picos foi realizado no comprimento de onda de 215 nm. A fase móvel constituiu de um sistema isocrático (água acidificada – 1% H₂PO₄:acetonitrila, 15:85 v/v) com um fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção da amostra igual a 10 µL. O tempo de corrida foi de 20 min, sendo o tempo de retenção do ácido shiquímico 7,4 min. A quantificação do ácido shiquímico foi feita também antes da aplicação do herbicida em todas as populações avaliadas.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância para detectar significância estatística e em seguida ajustados a curvas de regressão linear para comparação entre as quantidades de ácido shiquímico das populações analisadas.

2.3 Resultados e Discussão

Os resultados médios das avaliações da concentração de shiquimato nas populações que foram pulverizadas com glyphosate foram ajustados a equação linear simples, com bom ajuste dos dados, conforme pode ser observado na figura 2.1. Na tabela 2.1 estão representados os valores obtidos dos parâmetros de ajuste da equação a , b , F da regressão e sua respectiva significância, além do coeficiente de correlação R^2 . Houve significância estatística através do teste t ao nível de 5% de probabilidade para os dois parâmetros da equação (dados não apresentados) e o valor de R^2 próximo de 0,97 para ambas as equações evidenciam também um bom ajuste dos dados no modelo linear simples.

O acréscimo do valor acumulado de shiquimato nas plantas S a partir dos 2 DAA (2.629,00 mg de shiquimato kg^{-1} de matéria seca) para 18.980,14 mg de shiquimato kg^{-1} de matéria seca aos 7 DAA na planta de buva indica a ação do herbicida inibindo a EPSPS, e conseqüentemente resultando no acúmulo de shiquimato. Inesperadamente houve também acúmulo de shiquimato nos tecidos das plantas R, porém em uma intensidade muito menor, ou seja, de 2791,60 mg de shiquimato kg^{-1} de matéria seca aos 2 DAA para 10.683,85 mg de shiquimato kg^{-1} de matéria seca, indicando claramente que as plantas R estudadas tem um nível de inibição menor da EPSPS e conseqüentemente podem ser consideradas resistentes a este herbicida. Resultados semelhantes foram obtidos por Mueller et al. (2003) que observaram acúmulo maior que 1.000 $\mu\text{g g}^{-1}$ de shiquimato em tecidos de plantas R; no entanto, existiram diferenças significativas nos padrões de acúmulo de shiquimato entre os biótipos R e S de buva.

A tabela 2.2 representa a quantidade de shiquimato nas plantas sem aplicação do herbicida. As diferenças encontradas não devem ser atribuídas a diferenças fenotípicas entre os biótipos, pois a dimensões dos valores encontrados são insignificantes quando comparados aos dados das plantas após a aplicação do herbicida. Na pesquisa desenvolvida por Mueller et al. (2003), a concentração de shiquimato em plantas não

tratadas com glyphosate foi menor que $100 \mu\text{g g}^{-1}$, que foi significativamente menor que aquelas que tinham sido tratadas com glyphosate na dose de $0,84 \text{ kg e.a ha}^{-1}$. Estes resultados confirmam nos dados obtidos na presente pesquisa que sem a aplicação de glyphosate existe acúmulo de shiquimato na planta.

Um dos aspectos práticos desta pesquisa é que o herbicida foi aplicado em plantas intactas e na dose recomendada do produto para a planta (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005), ou seja, $720 \text{ g e.a ha}^{-1}$. Bioensaios desenvolvidos relatados na literatura utilizam discos foliares que recebem concentrações de glyphosate para em seguida ser medido o acúmulo de shiquimato. No ensaio desenvolvido com disco foliares de milho para medir o acúmulo de shiquimato seguido da imersão em solução de glyphosate em concentrações que variaram de 25 a 2.500 ppm, houve uma correlação linear entre o acúmulo de shiquimato e a quantidade de glyphosate aplicado (CHIANG; CHIANG, 2006).

Koger et al. (2005) testaram dois tipos de bioensaios não destrutivos com o objetivo de diferenciar biótipos resistentes de suscetíveis de buva ao glyphosate. Para isso foram utilizados discos foliares ou folhas inteiras provenientes de plantas R e S de buva, que foram imersas em solução de glyphosate para que depois de: 3 dias para os discos foliares, e 16 h para as folhas inteiras, fosse medido o acúmulo de shiquimato. Através dos resultados foi possível concluir que ambos os bioensaios foram capazes de diferenciar biótipos resistentes de biótipos suscetíveis de buva e poderia ser de grande utilidade na detecção de populações de plantas daninhas resistentes ao glyphosate no campo.

Como houve acúmulo de shiquimato nas plantas R, porém em menor intensidade que na planta S, pode-se inferir que o mecanismo de resistência nestas plantas de buva não é resultante de uma insensibilidade total da EPSPS ao glyphosate em plantas suscetíveis. Caso houvesse total insensibilidade da EPSPS ao glyphosate na planta R não haveria acúmulo de shiquimato nestas plantas. Dentre os mecanismos de resistência das plantas daninhas ao glyphosate relatados na literatura destaca-se o trabalho de Feng et al. (2004) que sugere que a resistência é provavelmente devido a uma distribuição celular alterada do glyphosate que impede o carregamento do herbicida no floema e a importação para dentro dos plastídios resultando assim em translocação

geral reduzida do herbicida na planta. Sendo assim, se este mecanismo de resistência for a causa do biótipo em estudo na presente pesquisa, isto explica o acúmulo de shiquimato nas plantas resistente.

Outros mecanismos de resistência ao glyphosate têm sido relatados na literatura, como amplificação gênica e insensibilidade da EPSPS ao herbicida. Na caracterização dos níveis de expressão gênica e sensibilidade da EPSPS de azevém (*Lolium multiflorum*) feita por Baerson et al. (2002) foi observado evidências de amplificação gênica ou co-segregação do gene específico da enzima variante no biótipo resistente. Já no trabalho de Ng (2004) estudando a planta daninha capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica*) foi observado que a resistência ao glyphosate é resultante de um gene de dominância incompleta, nuclear e monogênica. Na presente pesquisa o mecanismo de insensibilidade da enzima relatado no trabalho com capim-pé-de-galinha provavelmente não é o mecanismo, pois neste caso não haveria acúmulo de shiquimato na planta R.

Como pode ser observado na Figura 2.1 não houve avaliação aos 10 dias do ácido shiquímico da parte aérea proveniente das plantas S, mas somente das plantas R. Este fato ocorreu pois as plantas S no momento da coleta do material estavam mortas e portanto impossibilitou a análise do mesmo. Desta maneira, foi possível comprovar que o biótipo em estudo com suspeita de resistência era realmente resistente ao glyphosate, pois foi aplicada a dose recomendada do herbicida. Na definição de resistência normalmente utilizada nos critério para relato de resistência pelo HRAC (“herbicide resistance action committee”), divulgada por Heap (2008), consta que para que uma planta ser considerada resistente deve ser seguido alguns critérios, dentre eles de que deve ser seguida a definição da resistência. De acordo com o autor a resistência é definida como sendo a habilidade herdável de uma planta sobreviver e reproduzir após exposição a uma dose de herbicida normalmente letal para a população original. Sendo assim, a dose normalmente letal nesta pesquisa foi considera a dose recomendada de 720 g e.a. ha⁻¹ (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005).

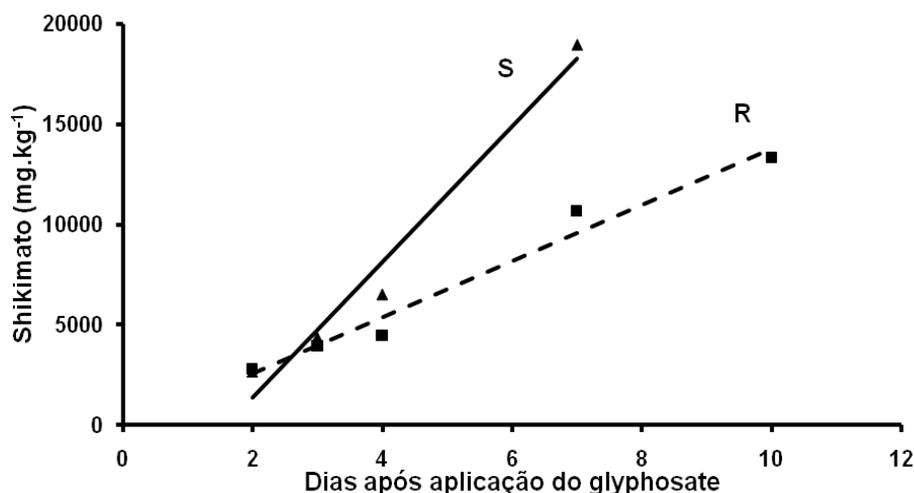


Figura 2.1 - Concentração de shiquimato nas plantas resistentes (R) e suscetíveis (S), sendo as retas contínuas e tracejadas representam os valores contínuos ajustados pela equação de regressão linear para as plantas R e S respectivamente, assim como os símbolos triangulares e quadrados representam a média dos valores originais obtidos no experimento para as plantas R e S respectivamente

Tabela 2.1 - Parâmetros da equação linear do tipo $y = a + b.x$, utilizada para ajuste dos resultados de acúmulo de shiquimato nas plantas R e S de buva

	a	b	F da regressão	P>F	R ²
Plantas suscetíveis	-5411,22	3381,09	65,09	0,015	0,970
Plantas resistentes	3381,09	1408,88	110,54	0,0018	0,973

Tabela 2.2 - Quantidade média de shiquimato nas plantas R e S antes do tratamento com glyphosate

Plantas S	Plantas R
19,01	0,00
15,75	0,00
0,00	0,00
50,77	0,00

2.4 Conclusões

O procedimento de isolamento e quantificação do ácido shiquímico á partir de plantas intactas tratadas com glyphosate é um procedimento adequado para diferenciação de plantas resistentes de plantas suscetíveis de buva (*Conyza bonariensis*) ao glyphosate. A população suspeita de resistência utilizada nesta pesquisa foi confirmada como resistente ao glyphosate. Apesar de especulativo através de evidências indiretas, o mecanismo de resistência do biótipo de buva estudado não está relacionado com insensibilidade da EPSPS ao glyphosate.

Referências

ARNAUD, L.; NURIT, F.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Distribution of glyphosate and its target enzyme inside wheat plants. **Pesticide Science**, Waterbury, v. 40, p. 217-223, 1994.

BAERSON, S.R., RODRIGUEZ, D.J., BIEST, N.A., TRAN, M., YOU; KREUGER, R.W.; DILL, G.M.; PRATLEY, J.E.; GRUYS, K.J. Investigating the mechanism of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). **Weed Science**, Lawrence, v. 50, n. 6, p.721-730, 2002.

BECKIE, H.J.; HEAP, I.M.; SMEDA, R.J.; HALL, L.M. Screening for herbicide resistance in weeds. **Weed Technology**, Lawrence, v. 14, p. 428–445, 2000.

BRESNAHAN, G.A.; MANTHEY, F.A., HOWATT, K.A.; CHAKRABORTY, M. Glyphosate applied pre harvest induces shikimic acid accumulation in hard red spring wheat (*Triticum aestivum*). **Journal of Agriculture and Food and Chemistry**, Easton, v. 51, p. 4004–4007, 2003.

BROWN, S.M.; WHITWELL, T. Influence of tillage on horseweed, *Conyza canadensis*. **Weed Technology**, Champaign, v. 2, n. 3, p. 269-270, 1988.

CHIANG, Y.J.; CHIANG M.Y. Analysis of shikimate accumulation for diagnosis of glyphosate injury to crops. **Plant Protection Bulletin**, Taiwan, v. 48, p. 243-252, 2006.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Coord.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3. ed. Campinas: HRAC-BR, 2008. p. 9-34.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; GALLI, A.J.B.; CARVALHO, S.J.P.; MOREIRA, M.S.; FOLONI, L.L.; MARTINS, B.A.B.; RIBEIRO, D.N. Glyphosate sustainability in South American cropping systems. **Pest Management Science**, Hoboken, v. 64, n. 3, p. 422-427, 2008.

CROMARTIE, T.H; POLGE, N.D. An improved assay for shikimic acid and its use as a monitor for the activity of sulfosate. **Proceedings of the Weed Science Society of America**, v. 40, p. 291, 2000.

ESCORIAL, M.C.; SIXTO, H.; GRACIA-BAUDIN, J.M.; CHUECA, M.C. A rapid method to determine cereal plant response to glyphosate. **Weed Technology**, Lawrence, v. 15, p. 697-702, 2001.

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

HEAP, I. **The international survey of herbicide resistant weeds**. 2008. Disponível em: <<http://www.weedscience.com>>. Acesso em: 30 abr. 2008.

HENRY, B.H.; SHANER, D.L.; WEST, M.S. Shikimate accumulation in sunflower, wheat, and proso millet after glyphosate application. **Weed Science**, Lawrence, v. 55, p. 1-5, 2007.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2. ed. São Paulo: BASF, 1999. 978 p.

KOGER, C.H.; POSTON, D.H.; REDDY, K.N. Effect of glyphosate spray coverage on control of pitted morningglory (*Ipomoea lacunosa*). **Weed Technology**, Lawrence, v. 18, p. 124-130, 2004.

KOGER, C.H.; SHANER, D.L.; HENRY, W.B.; NADLER-HASSAR, T.; THOMASE, W.E.; WILCUT, J.W. Assessment of two nondestructive assays for detecting glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). **Weed Science**, Lawrence, v. 53, n. 4, p. 438-445, 2005.

MOREIRA, M.S. **Detecção, crescimento e manejo químico alternativo de biótipos das espécies de Buva *Conyza canadensis* e *C. bonariensis* resistentes ao herbicida glyphosate**. 2008. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2008.

MOREIRA, M.S.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S.J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Resistência de buva (*Conyza canadensis* e *C. bonariensis*) ao herbicida glyphosate. **Planta daninha**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 157-164, 2007.

MUELLER, T.C.; MASSEY, J.H.; HAYES, R.M.; MAIN, C.L.; STEWART, Jr. N.S. Shikimate accumulates in both glyphosate-sensitive and glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 3, p. 680–684, 2003.

NG, C.H.; RARNAMA, W.; SURIFA, S.; ISMAIB, B.S. Inheritance of glyphosate resistance in goosegrass (*Eleusine indica*). **Weed Science**, Lawrence, v. 54, n. 4, p. 564-570, 2004.

PADGETTE, S.R.; KOLACZ, K.H.; DELANNAY, X.; RE, D.B.; LAVALLEE, B.J.; TINIUS, C.N.; RHOADES, W.K.; OTERO, Y.L.; BARRY, G.F.; EICHOLTZ, D.A.; PESCHKE, V.M.; NIDA, D.L.; TAYLOR, N.B.; KISHORE, G.M. Development, identification, and characterization of a glyphosate tolerant soybean line. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 1451-1461, 1995.

PEREZ, A.; KOGAN, M. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. **Weed Research**, Lawrence, v. 43, p. 12–19, 2003.

PLINE, W.A.; WILCUT, J.W.; DUKE, S.O.; EDMISTEN, K.L.; WELLS, R. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and non glyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 506–512, 2002.

RIBEIRO, D.N. **Caracterização da resistência ao herbicida glyphosate em biótipos da planta daninha *Lolium multiflorum* (Lam.)**. 2008. 102 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, 2008.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Londrina, 2005. 592 p.

SHANER, D.L.; NADLER-HASSAR, T.; HENRY, W.B.; KOGER, C.H. A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs. **Weed Science**, Lawrence, v. 53, n. 6, p. 769-774, 2005.

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

VIDAL, R.A.; KALSING, A.; GOULART, I.C.G.R.; LAMEGO, F.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Impacto da temperatura, irradiância e profundidade das sementes na emergência e germinação de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* resistentes ao glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n. 2, p. 309-315, 2007.

3 ABSORÇÃO FOLIAR E TRANSLOCAÇÃO DO HERBICIDA GLYPHOSATE EM PLANTAS RESISTENTE E SUSCETÍVEL DE BUVA (*Conyza bonariensis* (L.) Cronquist.) A ESTE HERBICIDA

Resumo

Conhecer os mecanismos dos biótipos de plantas daninhas selecionados na agricultura com característica diferencial de resistência ao herbicida glyphosate é fundamental para o estabelecimento de estratégias de prevenção e manejo do fenômeno nos sistemas de produção. No entanto, até o momento são raras as informações científicas conclusivas para todos os biótipos resistentes ao glyphosate (R) relatados na agricultura, especialmente nos biótipos R encontrados no Brasil. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi de avaliar comparativamente a absorção foliar e translocação na planta do herbicida glyphosate nos biótipos R e suscetível ao herbicida glyphosate (S), da planta daninha buva (*Conyza bonariensis*), visando explicar o mecanismo de resistência deste biótipo R. No estágio de desenvolvimento fenológico de nove folhas às plantas R e S foram aplicadas com uma solução de glyphosate contendo uma mistura de produto técnico + radiomarcado (^{14}C) através de quatro gotas, totalizando um volume de 1,0 μL , na face adaxial de três folhas por planta. A radioatividade em diferentes partes da planta foi determinada 4, 8, 24, 48 e 72 horas após o tratamento (HAT), sendo quantificada por espectrometria de cintilação líquida (ECL). Os resultados mostraram que em média 98% do herbicida aplicado foi absorvido pelos biótipos R e S estudados 72 HAT. Deste total, cerca de 70% da radioatividade absorvida permaneceu nas folhas tratadas de ambos os biótipos. Quanto à fração do herbicida translocada foi observado que o biótipo S apresentou maior translocação para as raízes, quando comparado ao biótipo R. Desta forma, conclui-se que a translocação diferencial é um dos mecanismos envolvidos na resistência do biótipo R de *C. bonariensis* ao herbicida glyphosate no Brasil.

Palavras-chave: Buva; Herbicida; Radioatividade

Abstract

To know the mechanisms of biotypes of the weeds selected in the agriculture with differential characteristics of resistance to the herbicide glyphosate is fundamental for the establishment of prevention and management strategies of the phenomenon in the cropping systems. However, at this moment there is not much conclusive scientific information for all the resistant biotypes of glyphosate (R) reported in the agriculture, especially in the R biotypes found in Brazil. Therefore, the objective this research was to evaluate comparatively the foliar uptake and translocation of herbicide glyphosate in the two biotypes R and susceptible (S) to glyphosate, of the weed hairy fleabane (*Conyza*

bonariensis), in order to elucidate the mechanism of resistance of *C. bonariensis* to glyphosate. At the phenological stage of nine leaves, the R and S plants were applied with a glyphosate solution containing a mixture of technical product + radiolabelled (^{14}C), by four drops, totalizing 1,0 μL per leaf, on the adaxial face of three leaves per plant. The radioactivity in different parts of the plant was determined at 4, 8, 24, 48 and 72 hours after treatment (HAT), being quantified by liquid scintillation spectrometry. The results showed that in average 98% of the total applied herbicide was absorbed by the R and S biotypes at 72 HAT. From this amount, about 70% of the absorbed radioactivity remained in the treated leaves of both biotypes. With regard to the fraction of the translocated herbicide, it was observed that the S biotype showed more translocation to the roots in comparison to the R biotype. Therefore, it may be concluded that the differential translocation is one of the mechanisms involved in the resistance of the R biotype of *C. bonariensis* to herbicide glyphosate in Brazil.

Keywords: Hairy fleabane; Herbicide; Radioactivity

3.1 Introdução

A planta *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist, conhecida popularmente como buva, apresenta de ciclo de vida anual, originária dos Estados Unidos da América do Norte (STUBBENDIECK; FRIISOE; BOLICK, 1995), sendo o mecanismo principal de disseminação de suas sementes o vento. Ecologicamente a *C. canadensis* tem capacidade de se estabelecer espontaneamente em condições ambientais distintas (FERNALD, 1950; BHOWMIK; BEKECH, 1993). Estas plantas eram infestantes freqüentes de áreas agrícolas abandonadas, porém, com a evolução da agricultura conservacionista através da redução das práticas convencionais de preparo de solo, e a adoção dos sistemas mais sustentáveis de conservação de solos nas últimas três décadas, principalmente com o sistema de semeadura direta, houve seleção desta espécie de planta daninha nos sistemas de produção atuais (BHOWMIK; BEKECH 1993; BUHLER; OWEN, 1997; WEAVER, 2001).

É de conhecimento de todos que o principal herbicida utilizado para manejo da vegetação nos sistemas de produção envolvendo o plantio direto é o glyphosate. Sendo assim, biótipos da planta daninha *C. bonariensis* estão constantemente sob pressão de seleção deste herbicida devido à suscetibilidade das populações originais.

O herbicida glyphosate, derivado do aminoácido glicina, atua na rota metabólica do ácido shiquímico, através da inibição competitiva com o fosfo-enol-piruvato (PER) pelo sítio ativo da 5-enol-piruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), promovendo deste modo a redução da síntese de 5-enol-piruvil-shiquimato-3-fosfato, precursora da síntese dos aminoácidos aromáticos e compostos fenólicos (MOREIRA; CHRISTOFFOLETI, 2008). A absorção do glyphosate pela planta envolve uma fase de rápida penetração através da cutícula, seguida por uma fase simplástica lenta (MONQUERO et al., 2004). A duração desse processo é dependente de vários fatores, como espécie e idade da planta, condições ambientais e concentração do herbicida na calda e do surfactante. Após a penetração, o glyphosate é translocado via floema, seguindo a mesma rota dos açúcares, que são produzidos nas folhas fotossinteticamente ativas (fonte), até os tecidos da planta (dreno) que necessitam destes açúcares para promover o crescimento, manutenção ou armazenamento, como é o caso das raízes e regiões meristemáticas (DEVINE; BANDEEN; MICKERSIE, 1983).

A seleção de populações de plantas daninhas resistentes ao herbicida glyphosate é recente, quando comparada com herbicidas de outros mecanismos de ação, por exemplo com os inibidores da ALS (acetolactato sintase). Somente depois de 20 anos de comercialização do herbicida glyphosate no mundo é que foi relatado o primeiro caso de resistência, ou seja na década de 90 (DYER, 1994). Assim, no início da era de comercialização do herbicida glyphosate para a agricultura, vários pesquisadores e técnicos afirmavam que a seleção de populações de plantas daninhas resistentes ao glyphosate era pouco provável de ocorrer (BRADSHAW et al., 1997; BRACAMONTE; NOVO; RINDERSTMA, 2001). No entanto, contrariando a previsão, os fatores que permitiram a seleção de populações de plantas daninhas resistentes ao glyphosate foram: utilização intensiva do herbicida glyphosate nos sistemas de produção acima da previsão imaginável na época, grande adoção por parte dos agricultores de sistemas de produção com enfoque conservacionistas de solo, e ocorrência de espécies de plantas daninhas altamente prolíficas nas áreas de aplicação do glyphosate, as quais apresentam alta capacidade de se adaptar aos sistemas de produção adotados (MOREIRA; CHRISTOFFOLETI, 2008).

Foram elucidados até o momento pelo menos quatro mecanismos que podem explicar a resistência de uma planta a herbicidas: redução da concentração do herbicida no local de ação; absorção foliar e/ou translocação reduzida do herbicida; metabolização e/ou detoxificação intensa do herbicida a substâncias menos fitotóxicas; e perda de afinidade do herbicida pelo local de ação devido a uma alteração deste local, resultante de variabilidade genética (SHERMAN; VAUGHN; DUKE, 1996).

Diversas pesquisas têm sido conduzidas com o objetivo de elucidar os mecanismos de resistência de plantas daninhas ao glyphosate, porém ainda não estão totalmente esclarecidos (MOREIRA; CHRISTOFFOLETI, 2008). Ribeiro (2008) estudou os prováveis mecanismos de resistência de populações *Lolium multiflorum*, e observou que o biótipo R apresentou menor translocação em relação ao biótipo S, sendo considerado como um mecanismo de resistência, mas não o único. Segundo Powles e Preston (2006), é esperado que em populações resistentes de *Lolium*, diferentes mecanismos de resistência sejam encontrados, por se tratar de uma espécie que apresenta grande diversidade genética. Já os trabalhos desenvolvidos com *Conyza canadensis*, mostraram que as plantas S apresentam maior capacidade de exportar o glyphosate para outras partes da planta, o que não acontece com as plantas R (FENG et al., 2004; KOGER; REDDY, 2005; DINELLI et al., 2006). Porém, as características moleculares e/ou bioquímicas responsáveis por esta diferença na translocação entre os biótipos ainda são desconhecidas.

Outros mecanismos de resistência como a alteração no sítio de ação do herbicida também foram encontrados em algumas espécies de plantas daninhas, como é o caso da *Eleusine indica* descrito por Tran et al. (1999). Neste trabalho, a resistência ao glyphosate não foi atribuída à absorção, translocação e metabolismo diferencial, mas sim a uma alteração na EPSPS, exatamente no aminoácido localizado na posição 106, onde a mutação ocorrida no gene codificador da referida enzima resultou na substituição do aminoácido prolina pelo aminoácido (BAERSON et al., 2002; NG et al., 2003). Esta mesma mutação encontrada em populações de *Eleusine indica*, também foi encontrada em populações resistentes de *Lolium rigidum* do Chile (PEREZ-JONES et al., 2005) e da Austrália (WAKELIN; PRESTON, 2005).

Conhecer os mecanismos dos biótipos de plantas daninhas selecionados na agricultura com característica diferencial de resistência ao herbicida glyphosate é fundamental para o estabelecimento de estratégias de prevenção e manejo do fenômeno nos sistemas de produção. No entanto, até o momento não existem informações científicas conclusivas para todos os biótipos resistentes ao glyphosate relatados na agricultura, especialmente nos biótipos R encontrados no Brasil. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo avaliar comparativamente a absorção foliar e translocação na planta do herbicida glyphosate nos em dois biótipos, R e S ao herbicida glyphosate, da planta daninha de buva (*Conyza bonariensis*), visando explicar o mecanismo de resistência deste biótipo R *C. bonariensis* ao glyphosate.

3.2 Material e Métodos

As plantas foram cultivadas sob condições da casa de vegetação localizada no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), município de Piracicaba-SP (22° 42' 30" S, 47° 38' 00" W e 546 m de altitude). As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Ecotoxicologia – CENA/USP e no Laboratório de Radioquímica da BIOAGRI Laboratórios Ltda., Piracicaba-SP. Duas populações de *Conyza bonariensis* foram utilizadas: uma resistente (R) ao glyphosate, oriundo de sementes coletadas em área com histórico de aplicação do herbicida de pelo menos 10 anos consecutivos, no município de Cruz Alta- RS. Estas sementes foram cedidas pelo pesquisador da Embrapa – Trigo, Passo Fundo – RS Leandro Vargas, o qual já havia submetido este lote de sementes a ensaios de curva de dose-resposta, comprovando tratar-se de uma população resistente. A outra população estudada foi uma suscetível (S), cujas sementes foram coletadas no município de Piracicaba-SP, em uma área sem histórico de aplicação de glyphosate.

As sementes foram coletadas de plantas em estágio de plena maturação, e identificadas de acordo com o local e dia de coleta. Para identificação foram utilizadas características morfológicas descritas em Kissmann e Groth (1999). Posteriormente, foi feita a semeadura em bandejas de plástico contendo uma mistura de substrato comercial e vermiculita na proporção 1:1.

Aproximadamente 10 dias após a semeadura, grande parte das sementes havia emergido, e quando as plantas se apresentaram no estágio fenológico de duas folhas verdadeiras, foram transferidas individualmente para vasos com capacidade para 500 mL, devidamente preenchidos com substrato comercial e adubados com a formulação comercial de 14-14-14 (N-P-K) na dose de 2,0 g por vaso.

O delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 2 com quatro repetições. Foi utilizada uma sub-dose de glyphosate equivalente a $7,2 \times 10^{-3}$ g e.a. ha⁻¹ com cinco tempos de avaliação e dois biótipos de *C. bonariensis*. Quando as plantas se apresentaram com 9-10 folhas verdadeiras, foi feita a seleção das plantas mais homogêneas e estas foram levadas para o Laboratório de Ecotoxicologia (CENA/USP), onde foi realizada a aplicação do herbicida nas folhas.

A solução do herbicida (Solução de trabalho) foi preparada através da diluição de glyphosate marcado com carbono 14 (Atividade específica 1,456 MBq/mmol), e glyphosate comercial, de forma a obter uma concentração final equivalente a $7,2 \times 10^{-3}$ g e.a. ha⁻¹, com radioatividade de 0,06 MBq µL⁻¹.

A aplicação do herbicida foi feita através de um microaplicador (Hamilton PB6000 Dispenser Hamilton Co. EUA), na fase adaxial de três folhas na parte mediana da planta, sob a forma de quatro gotas de 1,0 µL cada uma, totalizando 12 gotas por planta com radioatividade de 0,67 MBq por planta.

A absorção e translocação foram avaliadas aos 4, 8, 24, 48 e 72 horas após tratamento (HAT) com o herbicida. Em cada período as plantas foram retiradas dos vasos e divididas em raízes, parte aérea e folha tratada, com o objetivo de quantificar a radioatividade em cada uma delas. As folhas tratadas foram removidas da planta e lavadas com metanol 80% para se determinar a fração do herbicida não absorvida pela folha. O líquido resultante da lavagem das folhas foi adicionado a frascos de cintilação contendo solução cintiladora, e em seguida a radioatividade contida em cada frasco foi determinada por espectrometria de cintilação líquida (ECL) (Packard 1900 TR). As análises dos tecidos das raízes, parte aérea e folha tratada foram realizadas através da combustão das amostras em oxidador biológico (OX 600 Harvey Instruments). Posteriormente, a radioatividade foi quantificada por ECL.

A absorção do herbicida pela folha foi determinada como sendo a porcentagem da radioatividade contida no interior da planta (parte aérea, folha tratada e raízes) em relação a radioatividade total recuperada (líquido de lavagem das folhas + radioatividade no interior da planta). Para o cálculo da translocação, foi considerada a radioatividade em cada parte da planta em relação à radioatividade total recuperada.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de comparação múltipla de Tukey (5% de probabilidade).

Estudos qualitativos de translocação foram realizados através de autoradiografia. As plantas utilizadas foram tratadas da mesma forma como citado anteriormente, porém em cada período de coleta as plantas foram lavadas, secas e prensadas e posteriormente, foram passadas em um radio scanner (Packard-Cyclone).

3.3 Resultados e Discussão

Os resultados da análise de variância não indicaram diferenças estatisticamente significativa entre os biótipos R e S com relação a absorção de glyphosate pelas folhas que receberam as micro gotas de solução de herbicida radiomarcado. Sendo assim, no gráfico da figura 3.1 estão apresentadas as médias de absorção dos biótipos R e S. Em ambos os biótipos de buva estudados, a porcentagem de glyphosate absorvida até 72 HAT foi de aproximadamente 98% da radioatividade total aplicada, não havendo diferença entre as plantas R e S (Figura 3.1). Koger e Reddy (2005) também não observaram diferenças na quantidade de glyphosate absorvida pelos biótipos R e S de *Conyza canadensis*.

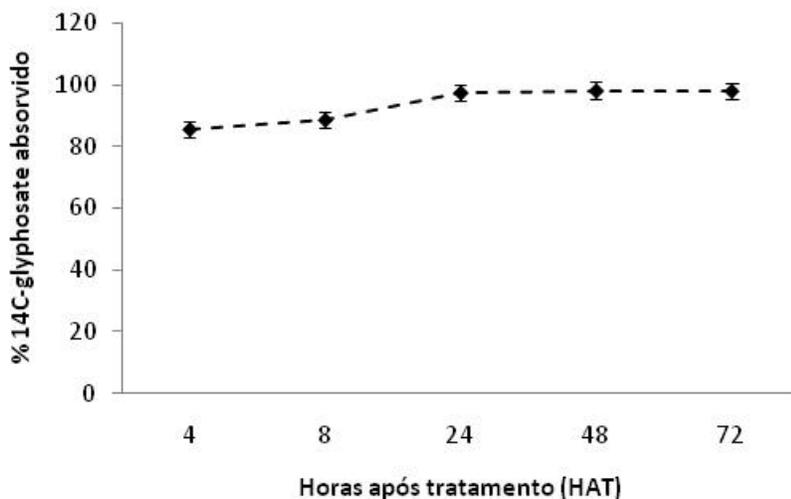


Figura 3.1 - Absorção média do ¹⁴C-glyphosate nos biótipos resistente (R) e suscetível (S) de *Conyza bonariensis*

Após 72 horas, cerca de 70% do total de ¹⁴C-glyphosate absorvido permaneceu nas folhas tratadas dos biótipos resistente e suscetível (Figura 3.2). Feng et al. (2004), Koger e Reddy (2005) e Dinelli et al. (2006), estudaram biótipos de *Conyza canadensis* resistentes e suscetíveis ao glyphosate e observaram alta retenção do herbicida pela folha tratada do biótipo resistente.

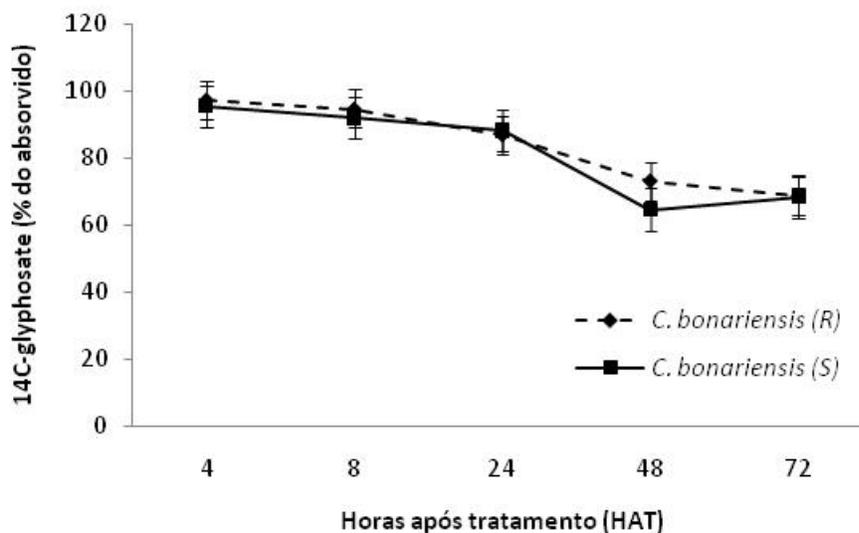


Figura 3.2 - ¹⁴C-glyphosate remanescente nas folhas tratadas dos biótipos resistente (R) e suscetível (S) de *Conyza bonariensis*.

Com relação à quantidade do herbicida translocado, foram observadas diferenças entre os biótipos R e S. Após 72 horas, 36,1% do total do herbicida absorvido foi translocado para as raízes do biótipo suscetível enquanto que no biótipo resistente, a translocação para as raízes foi de 21,6% (Tabelas 3.1 e 3.2). O mesmo resultado foi observado por Feng et al. (2004) e posteriormente por Koger e Reddy (2005) em biótipos resistentes e suscetíveis de *C. canadensis*. Considerando que o glyphosate se move tanto pelo floema quanto pelo xilema (PETERSON, 1989) e que seu transporte pelo xilema é aproximadamente 20-50 vezes mais rápido que no floema (KLEIER; HSU, 1996), pode-se inferir que o transporte preferencial da molécula seria em direção às folhas (DINELLI et al., 2006).

Mais recentemente, Ferreira et al. (2008) estudaram a translocação do glyphosate em biótipos resistente e suscetível de *C. bonariensis*, e também notaram que a translocação do herbicida é muito maior no biótipo suscetível, sendo a raiz o órgão da planta com maior concentração e glyphosate. Cerca de 20% do ¹⁴C-glyphosate aplicado foi encontrado nas raízes das plantas suscetíveis 72 horas após a aplicação, contrastando com as plantas resistentes, cuja radioatividade encontrada foi de 5%. Os autores também concluíram que a translocação diferencial está entre os mecanismos de resistência de *C. bonariensis* ao glyphosate.

Tabela 3.1 - Porcentagem da radioatividade absorvida em *Conyza bonariensis* resistente nos diferentes tempos de coleta

HAT	Folhas tratadas	Parte aérea	Raiz
% da radioatividade absorvida			
4	97,57a	0,73b	1,70b
8	94,87ab	1,23b	3,90b
24	87,10b	3,0b	9,90b
48	73,27c	5,1b	21,60a
72	68,77c	9,7a	21,60a
DMS	8,50	4,54	9,87
F	49,51**	13,94**	20,07**

**Valor de F significativo a 1% de probabilidade. Médias seguidas por letras iguais, na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 3.2 - Porcentagem da radioatividade absorvida em *Conyza bonariensis* suscetível nos diferentes tempos de coleta

HAT	Folhas tratadas	Parte aérea	Raiz
% da radioatividade absorvida			
4	95,57a	1,17c	3,30c
8	92,03a	1,77bc	6,20c
24	88,03ab	2,07abc	9,67bc
48	64,63c	4,73ab	30,60a
72	68,70bc	5,23a	36,07a
DMS	21,09	3,23	17,88
F	9,82**	7,13**	10,32**

**Valor de F significativo a 1% de probabilidade. Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O estudo de autoradiografia das plantas ilustra o resultado em ambos os biótipos. Pelas imagens (Figura 3.3) observa-se que grande parte da radioatividade permaneceu na folhas tratadas em ambos os biótipos (as regiões mais escuras representam as áreas de maior radioatividade).

Em outras espécies de plantas, a translocação diferencial tem sido pouco reportada como um mecanismo de resistência de plantas daninhas a herbicidas. Entretanto, pelo fato do glyphosate ser uma molécula de translocação rápida e eficiente, qualquer redução no transporte do herbicida para áreas suscetíveis da planta pode ocasionar um grande efeito no que diz respeito à mortalidade das plantas (PRESTON; WAKELIN, 2008). Os mecanismos que levam à redução na translocação ainda não foram esclarecidos. Segundo Pedersen et al. (2007), a translocação diferencial em plantas pode significar algum prejuízo na adaptabilidade ecológica das plantas resistentes. Lorraine-Colwill et al. (1999), atribuíram a redução da translocação em biótipos resistentes à uma possível alteração nas proteínas transportadoras existentes no cloroplasto. Mais tarde, os mesmos autores especularam sobre um possível envolvimento dos transportadores da membrana plasmática (LORRAINE-COLWILL et al., 2003). Feng et al. (2004) sugerem que a resistência é provavelmente devido a uma distribuição celular alterada do glyphosate que impede o carregamento do herbicida no floema e a importação para dentro dos plastídios resultando assim em translocação geral reduzida do herbicida na planta.

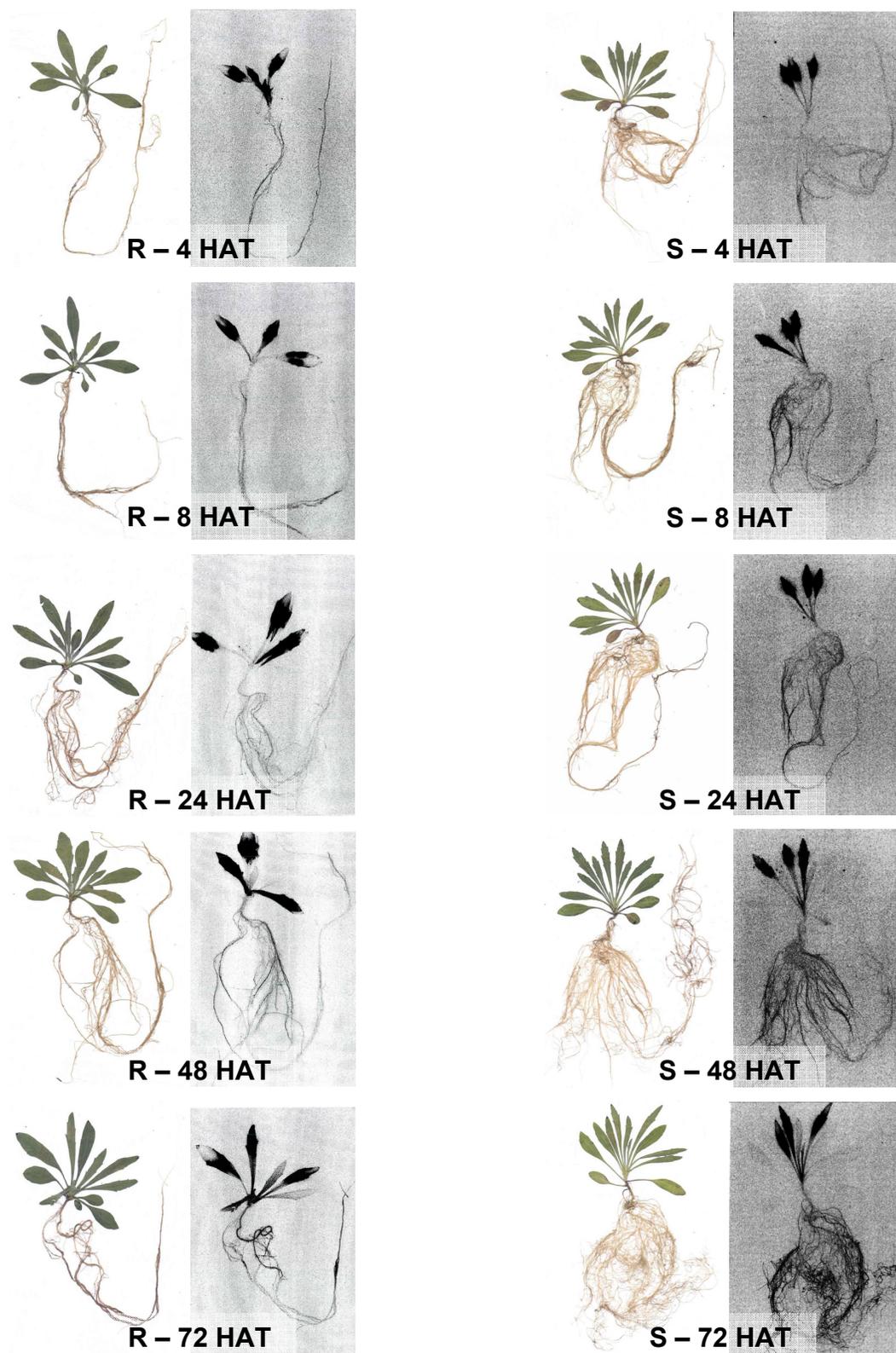


Figura 3.3 - Autoradiografias da translocação do ^{14}C -glyphosate pelos tecidos vegetais de *C. bonariensis* resistente (R) e suscetível (S) ao herbicida glyphosate

3.4 Conclusões

A translocação diferencial pode ser considerada como um dos mecanismos envolvidos na resistência de *C. bonariensis* ao glyphosate. A diferença de translocação do herbicida nos biótipos resistente e suscetível utilizados neste estudo ficou bastante evidente nos resultados apresentados, porém estudos complementares são necessários para comprovar a existência de outros mecanismos de resistência nesta espécie.

Referências

- BAERSON, S.R.; RODRIGUEZ, D.J.; TRAN, M.; FENG, Y.M.; BIEST, N.A.; DILL, G.M. Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 129, n. 3, p. 1265–1275, 2002.
- BHOWMIK, P.C.; BEKECH, M.M. Horseweed (*Conyza canadensis*) seed production, emergence and distribution in no-tillage and conventional-tillage corn (*Zea mays*). **Agronomy**, New York, v. 1, n. 1, p. 67-71, 1993.
- BRACAMONTE, E.R.; NOVO, R.J.; RINDERSTMA, L. Impacto de la soja (*Glycine max* (L.) Merrill) transgénica em el perfil productivo agrícola en Argentina. In: DE PRADO, R.; JARRÍN, J.V. (Ed.) **Uso de herbicidas en la agricultura del siglo XXI**. Córdoba, 2001. Córdoba: Universidad de Córdoba, Servicio de Publicaciones, 2001. p. 619-625
- BRADSHAW, L.D.; PADGETTE, S.R.; KIMBALL, S.L.; WELLS, B.H. Perspective of glyphosate resistance. **Weed Technology**, Lawrence, v. 11, n. 2, p. 189-198, 1997.
- BUHLER, D.D.; OWEN, M.D.K. Emergence and survival of horseweed (*Conyza canadensis*), **Weed Science**, Lawrence, v. 45, n.1, p. 98–101, 1997.
- DEVINE, M.D.; BANDEEN, J.D.; MICKERSIE, B.D. Temperature effects on glyphosate absorption, translocation and distribution in quackgrass (*Agropyron repens*). **Weed Science**, Lawrence, v. 31, n. 4, p. 461-464, 1983.
- DINELLI, G.; MAROTTI, I.; BONETTI, A.; MINELLI, M.;CATIZONE, P.; BARNES, J. Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 86, n. 1, p. 30–41, 2006.
- DYER, W.E. Resistance to glyphosate. In: POWLES, S.B.; HOLTUM, J.A.M. (Ed.). **Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry**. Boca Raton: Lewis, 1994. p. 229–242.

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

FERNALD, M.L. **Gray's manual of botany**. 8th ed. New York: American Book, 1950. 1447 p.

FERREIRA, E.A.; SILVA, A.A.; REIS, M.R.; SANTOS, J.B.; OLIVEIRA, J.A.; VARGAS, L.; KHOURI, K.R.; GUIMARÃES, A.A. Distribuição de glyphosate e acúmulo de nutrientes em biótipos de azevém. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 1, p. 165-173, 2008.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2. ed. São Paulo: BASF, 1999. 978 p.

KLEIER, D.A.; HSU, F.C. Phloem mobility of xenobiotics. VII the design of phloem systemic pesticides. **Weed Science**, Lawrence, v. 44, n. 5, p. 749–756, 1996.

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

LORRAINE-COLWILL, D.F.; POWLES, S.B.; HAWKES, T.R.; HOLLINSHEAD, P.H.; WARNER, A.J.; PRESTON, C. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. New York, v. 74, n. 1, p. 62–72, 2003.

LORRAINE-COLWILL, D.F.; HAWKES, T.R.; WILLIAMS, P.H.; WARNER, S.A.J.; SUTTON, P.B.; POWLES, S.B.; PRESTON, C. Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. **Pesticide Science**. Washington, v. 55, n. 3, p. 489–491, 1999.

MONQUERO, P.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; OSUNA, M.D.; DE PRADO, R.A. Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 3, p. 445-451, 2004.

MOREIRA, M.S.; CHRISTOFFOLETI, P.J.. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da EPSPs (Grupo G). In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Coord.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3. ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a resistência de Plantas aos Herbicidas, 2008. p. 78-96.

NG, C. H.; WICKNESWARY, R.; SALMIJAH, S.; TENG, Y.T.; ISMAIL, B. S. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and –susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. **Weed Research**, Oxford, v. 43, n.1, p. 108–115, 2003.

PEDERSEN, B.P.; NEVE, P.; ANDREASEN, C.; POWLES, S.B. Ecological fitness of a glyphosate resistant *Lolium rigidum* population: growth and seed production along a competition gradient. **Basic Applied Ecology**, Berlin, v. 8, n. 3, p. 258-268, 2007.

PEREZ-JONES, A.K.; PARK, J.; COLQUHOUN, C.; MALLORY-SMITH, C.; KOGAN, M. **Identification of a mutation in the target enzyme EPSP synthase in a glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* biotype**. Lawrence: Weed Science Society of America, 2005. Abstract. 416.

PETERSON, C.A. Physicochemical factors governing the transport of xenobiotic chemicals in plants: movement into roots and partitioning between xylem and phloem, **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 239, p. 43–54, 1989.

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

PRESTON, C.; WAKELIN, A.M. Resistance to glyphosate from altered herbicide translocation pattern. **Pest Management Science**, Washington, v. 64, n. 4, p. 372-376, 2008.

RIBEIRO, D.N. **Caracterização da resistência ao herbicida glyphosate em biótipos da planta daninha *Lolium multiflorum* (Lam.)**. 2008. 102 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SHERMAN, T.D.; VAUGHN, K.C.; DUKE, S.O. Mechanism of action and resistance to herbicides. In: DUKE, S.O. (Ed.) **Herbicide resistant crops**. Boca Raton: CRC Press, 1996. p. 14-28.

STUBBENDIECK, J.; FRIISOE, G.Y.; BOLICK, M.R. **Weeds of Nebraska and the great plains**. Lincoln: Nebraska Department of Agriculture, 1995. p.122-123.

TRAN, M; BAERSON, S.; BRINKER, R.; CASAGRANDE, L.; FALLETI, M.; FENG, Y. Characterization of glyphosate resistant *Eleusine indica* biotypes from Malaysia. In: ASIAN-PACIFIC WEED SCIENCE SOCIETY CONFERENCE, 17., 1999, Bangkok. **Proceedings...** Bangkok: Weed Science Society of Thailand, 1999. p. 527-536.

WAKELIN, A. M.; PRESTON, C. **Target-site glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum* Gaudin)**. Lawrence: Weed Science Society of America, 2005. Abstract, 417.

WEAVER, S.E. The biology of Canadian weeds, *Conyza canadensis*. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 81, n. 4, p. 867-875, 2001.

4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA EPSPS EM *Conyza bonariensis* RESISTENTE AO GLYPHOSATE

Resumo

A EPSPS (5-enol-piruvilshiquimato-3-fosfato sintase) é uma enzima indispensável na síntese dos aminoácidos aromáticos em plantas. O glyphosate, quando aplicado em plantas, compete pelo mesmo sítio de ação desta enzima e desta forma a transformação de shiquimato em corismato é interrompida. Atualmente a buva (*Conyza bonariensis*) vêm apresentando casos de resistência em diversos países, porém seu mecanismo de resistência ainda não foi elucidado. Nesse sentido, este estudo teve por objetivo comparar os níveis da expressão gênica da EPSPS em biótipos de *C. bonariensis* resistente (R) e suscetível (S) ao glyphosate. Para tal, plantas de *C. bonariensis* contendo nove folhas verdadeiras foram submetidas a uma aplicação de glyphosate na dose equivalente a 720 g e a ha⁻¹. Amostras da parte aérea de plantas dos dois biótipos R e S foram coletadas 24 horas após o tratamento (HAT). Extração do c-DNA das plantas foi realizada e primers específicos para os genes codificadores da EPSPS 1, 2 e 3 foram desenhados com base em seqüências de *Conyza canadensis* depositadas no GenBank (AY545666, AY545667 e AY545668). *Primers* para o gene *elongation factor EF-1 alpha chain (EF1-α)* baseados na seqüência de *Arabidopsis thaliana* também foram desenhados. Posteriormente, reações de PCR foram realizadas em termociclador para a viabilização do cDNA e dos *primers*. A análise dos fragmentos obtidos foi feita através de eletroforese em gel de agarose 2%. Os resultados mostraram que existe alto grau de similaridade entre as seqüências obtidas dos genes *EPSPS* de *C. bonariensis* e as seqüências de *C. canadensis* depositadas no GenBank. Além disso, é possível sugerir que há relação entre a expressão dos genes *EPSPS* em *C. bonariensis* e a condição de resistência à ação do herbicida glyphosate em alguns indivíduos dessa espécie.

Palavras-chave: Buva; EPSPs; Genes; Primers

Abstract

The EPSPS (5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase) is an essential enzyme for aromatics amino acids synthesis in plants. The glyphosate, when applied in plants, competes for the same site of action of this enzyme and then, shikimate in corismate transformation is interrupted. So, the objective of this study was to compare the level of the EPSPS expression in resistant (R) and susceptible (S) biotypes of *C. bonariensis* to glyphosate. For this, plants of *C. bonariensis* containing nine true leaves were submitted a glyphosate application in a dose equivalent to 720 g e. a. ha⁻¹. Samples of aerial parts of the R and S plants were collected 24 hours after the treatment (HAT). The c-RNA extraction and the primers of the plants for the gens responsible for the codification of EPSPS1, 2 and 3 were designed based on the *Conyza canadensis*

sequence bank founded in the GenBank (AY545666, AY545667 e AY545668). Primers for the gen *elongation factor EF-1 alpha chain (EF1- α)* based on the sequence of *Arabidopsis thaliana* were employed. Subsequently, PCR reactions were conducted in a thermocycle for the c-DNA and primers viability. The analysis of the fragments obtained was conducted by eletrophoresis agarosis gel 2%. The results showed that there is a high similarity between the sequences obtained in EPSPS gens of *C. bonariensis* the sequence of *C. canadensis* founded in GenBank. Besides, it is possible to suggest that there is relation between EPSPS gen expression in *C. bonariensis* and the condition of resistance to glyphosate action in some plants of this specie.

Keywords: Hairy-fleabane; EPSPS; Gens; Primers

4.1 Introdução

Atualmente, o glyphosate é um dos herbicidas mais utilizados no Brasil e no mundo, no combate às plantas daninhas, perfazendo cerca de 12% das vendas globais e apresentando mais de 150 marcas comerciais (NICOLAI; CHRISTOFFOLETI, 2007).

O glyphosate age inibindo a enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), que é responsável pela conversão do shiquimato-3-fosfato e fosfoenolpiruvato em EPSP e fósforo inorgânico na rota do ácido shiquímico (GEIGER; FUCHS, 2002). A inibição da EPSPS resulta no acúmulo de ácido shiquímico nas plantas e na redução da biossíntese de aminoácidos aromáticos que são responsáveis pela síntese de proteínas (SIEHL, 1997).

No entanto, utilização repetitiva do glyphosate em áreas de culturas geneticamente modificadas com o gene tolerância ao glyphosate, bem como em áreas não agricultáveis, tem resultado no aparecimento de biótipos de plantas daninhas resistentes a este herbicida, como é o caso da buva resistente *C. canadensis*, descoberta em Delaware nos EUA em 2001 (VANGESSEL, 2001).

A resistência de plantas daninhas pode ser definida como sendo a capacidade inerente e herdável de alguns biótipos, dentro de uma determinada população, de sobreviver e se reproduzir após a exposição à dose de um herbicida, que normalmente seria letal a uma população normal (suscetível) da mesma espécie (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2008). Trata-se de um processo evolucionário onde os biótipos resistentes ocorrem naturalmente em baixa frequência, e a pressão de seleção exercida

pela aplicação repetitiva de um determinado herbicida ou de herbicidas diferentes, mas que apresentam o mesmo mecanismo de ação, aumenta a frequência dos indivíduos resistentes na população (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2003).

Assim como a *Conyza canadensis*, a *C. bonariensis* também desenvolveu resistência ao glyphosate sendo que os primeiros casos de resistência desta espécie foram relatados em pomares e vinícolas da África do Sul no ano de 2003, e posteriormente, em 2004 e 2005 em pomares da Espanha e Brasil, respectivamente (HEAP, 2007).

Embora os primeiros casos de buva resistente ao glyphosate tenham ocorrido a cerca de oito anos, o mecanismo de resistência que ocorrem nestas manifestações ainda não foram bem definidos. Alguns trabalhos foram realizados nos Estados Unidos com o intuito de identificar o mecanismo de resistência de buva ao glyphosate, contudo os resultados são pouco esclarecedores e ainda não há consenso sobre qual o mecanismo de resistência envolvido.

De acordo com Powles e Preston (2006) os dois principais mecanismos que parecem estar envolvidos na resistência de plantas ao glyphosate são a alteração no sítio da EPSPS e a redução da translocação do herbicida pelos tecidos meristemáticos da planta.

Nos trabalhos realizados por Lorraine-Colwill et al. (2003); Feng et al. (2004) e Koger e Reddy (2005), os autores atribuíram a resistência encontrada em biótipos destas espécies à redução na translocação do glyphosate para as regiões meristemáticas das plantas. Já o trabalho realizado por Mueller et al. (2003) sugerem a possibilidade da existência de isômeros da enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) em plantas resistentes, os quais possuiriam menor afinidade pela molécula de glyphosate, conferindo o caráter de resistência às plantas. Estudos realizados com *Eleusine indica* mostraram que uma substituição do aminoácido serina pela prolina na posição 106 do sítio alvo da enzima EPSPS, ocasionada por uma mutação, levou a uma redução na suscetibilidade ao glyphosate (BAERSON, 2002). Estudos subsequentes com *E. indica* da Malásia também identificaram uma substituição da prolina pela treonina na posição 106 em plantas resistentes ao glyphosate (NG et al., 2003, 2004). Mutações pontuais resultantes da substituição da serina e treonina na

posição 106 do sítio da EPSPS, também foram identificadas em plantas de *Lolium multiflorum* (azevém) oriundas do Chile (PEREZ-JONES et al., 2007). Estudando a mesma espécie azevém, Jasieniuk et al. (2008) encontraram uma mutação na posição 106 resultante da substituição da prolina pela alanina e consideraram tal alteração como o mecanismo de resistência da espécie ao glyphosate.

Pelo fato de os mecanismos de resistência em *C. bonariensis* ainda não terem sido totalmente elucidados, este trabalho teve por objetivo comparar os níveis de expressão gênica da EPSPS em biótipos resistente e suscetível de *C. bonariensis*.

4.2 Material e Métodos

O experimento foi instalado em casa de vegetação do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ - USP, localizado em Piracicaba – SP (22° 42' 30" latitude sul, 47° 38' 00" longitude oeste e 546 m de altitude), entre fevereiro e maio de 2009. Para tal, duas populações de buva (*Conyza bonariensis*), sendo uma resistente oriunda do município de Cruz Alta- RS e uma suscetível coletada no município de Piracicaba-SP em uma área sem histórico de aplicação de glyphosate foram utilizadas no experimento. Sementes dos dois biótipos foram coletadas de plantas adultas em estágio de maturidade fisiológica das sementes, sendo estas em seguida semeadas em vasos de 15 cm de diâmetro x 12 cm de altura contendo uma mistura de substrato comercial do tipo Plantmax e vermiculita na proporção de 2:1, devidamente adubado com 200 mg de N, P₂O₅ e K₂O. Posteriormente, quando os vasos atingiram o estágio fenológico de 8-9 folhas realizou-se uma aplicação de glyphosate comercial na dose de campo recomendada (720 g e.a. ha⁻¹). Decorridas 24 horas após a aplicação, amostras da parte aérea das plantas foram coletadas e armazenadas em freezer a -80°C até o processamento das análises para a realização da extração dos ácidos nucléicos.

Para se obter o RNA total das amostras, aproximadamente 100 mg de tecido foram macerados em nitrogênio líquido com a adição de 5 % polivinilpirrolidona (PVPP), no momento da maceração. A extração de RNA ocorreu utilizando TRIzol Reagent (Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante. O precipitado final foi seco e ressuspendido em 30 µL de água tratada com 0,01% DEPC. A integridade do RNA total

extraído foi confirmada por eletroforese em gel de 1,2 % agarose em tampão 1X SB (BRODY, 2004), aplicando-se uma alíquota de 2 µL do RNA total extraído de cada amostra. A quantificação do RNA extraído foi feita através da utilização de um espectrofotômetro (UV/Visible Spectrophotometer Ultrospec 1100 Pro, Amersham Biosciences). Após a quantificação do RNA total extraído, cerca de 12,5 µg de cada amostra foram submetidos a tratamento com DNase I (Fermentas), seguindo as especificações do fabricante. Em seguida, foi realizada a síntese da primeira fita do cDNA utilizando-se cerca de 3 µg do RNA total tratado com a enzima ImProm (Promega) e RNaseOUT (Invitrogen), em volume de reação de 25 µl.

Posteriormente, foram desenhados *primers* específicos para os genes codificadores da enzima 5-enol-piruvil-shiquimato-3-fosfato sintase 1, 2 e 3 (*EPSPS1*, *EPSPS2* e *EPSPS3*, respectivamente) (Tabela 4.1) baseados em seqüências de *Conyza canadensis* depositadas no GenBank (AY545666, AY545667 e AY545668, respectivamente). Também foram desenhados *primers* para o gene *elongation factor EF-1 alpha chain (EF1-α)* baseados na seqüência de *Arabidopsis thaliana* depositada no GenBank, nº de acesso AK221176 (Tabela 4.1), que foi utilizado como gene-referência em alguns experimentos. As regiões dos genes sobre as quais os *primers* foram desenhados podem ser conferidas no Anexo A. Para isso foi utilizado o programa Primer3, disponível no “site” <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/> (Rozen & Skaletsky, 2000) e um programa específico para verificação da estabilidade dos *primers* – NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>).

Tabela 4.1 - Seqüência dos *primers* utilizados para os experimentos e o tamanho do fragmento esperado na amplificação

Gene	Nome do primer	Seqüência (5' -> 3')	Tamanho esperado do produto
EPSPS1	EPSP1_2_F	CAAACCCCAAACCCCATC	145 pb
	EPSP1_R	GTGGCAACGGCAGAAACTA	
EPSPS2	EPSP1_2_F	CAAACCCCAAACCCCATC	165 bp
	EPSP2_R	GTGGAAGTGGCAGAGAAAGC	
	EPSP2art-F	GTTGCGGGACAAGCA	816 bp
	EPSP2art-R	AGGGCAACCACAGCAA	
EPSPS3	EPSP3_F	TCCTGGTGGAAAGGTGAAAT	154 bp
	EPSP3_R	CATCAACTTCAGTGTCATCCGT	
	EPSP2art-F	GTTGCGGGACAAGCA	202 bp
	EPSP2art-R	AGGGCAACCACAGCAA	
EF1 α	EF1alfa_F	ATGGTGACGCTGGTATGGTT	148 pb
	EF1alfa_R	TCCTTCTTGTCCACGCTCT	

Os *primers* foram diluídos em água ultrapura, sendo o estoque diluído a 100 μ M. Outra diluição estoque a 50 μ M foi preparada a partir do estoque mais concentrado e finalmente a solução de uso foi preparada na concentração 10 μ M.

Subsequentemente, as amostras de cDNA sintetizado (alíquota de 1 μ l da diluição 1:10 de cada amostra) foram submetidas à reações de PCR utilizando Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity (10 U μ l⁻¹) (Invitrogen[®]) e os seguintes componentes: PCR High Fidelity Buffer 1x, 0,2 mM dNTP, 3 mM MgSO₄, 0,3 μ M *primer Forward*, 0,3 μ M *primer Reverse* (Tabela 1) e H₂O miliQ autoclavada (completou-se para um volume final de 25 μ L). A temperatura para anelamento dos “primers” utilizados foi de 60°C. Foram realizados de 35 a 40 ciclos no termociclador com 30-60 seg a temperatura de 72°C para ação extensiva da Taq-polimerase.

Os fragmentos obtidos com as reações de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de 2% agarose em tampão 1 X SB. A cada uma das amostras foi adicionado um volume adequado de tampão de carregamento contendo o corante

SYBRGold. Os fragmentos gerados foram clonados no vetor pGEM-T *Easy Vector System* (Promega), seguindo as orientações do manual do fabricante, e foram encaminhados para seqüenciamento para confirmar a identidade de suas seqüências. As análises foram feitas através da ferramenta BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

As análises de RT-qPCR foram realizadas em um termociclador centrífugo RotorGene 3000, Corbett Research a partir de diluições 1:10 do cDNA total derivado da transcrição reversa das amostras de RNA tratadas com DNAase, sendo analisadas triplicatas de cada amostra. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 10 μ L, utilizando-se 1 μ L de cDNA nas diluições citadas acima, *primers* a 0,2 μ M (*forward* e *reverse*), Platinum SYBR-green qPCR SuperMix-UDG 1x (Invitrogen) e H₂O mili-Q esterilizada.

Inicialmente, foi obtida uma curva de eficiência de amplificação para cada “primer”. A curva de eficiência foi determinada em uma curva padrão uma diluição serial do mix de cDNAs das amostras a 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Em casos onde o gene foi pouco expresso, diluições mais pontuais foram realizadas. O coeficiente R^2 resultante foi considerado como ideal com valores acima de 0,98, com o valor de M (inclinação da reta) entre -3 e -4 foi considerado aceitável, sendo seu ótimo em torno de -3,2. A eficiência ideal deve ter valor igual a 1, o que corresponde a uma eficiência amplificação igual 2 (dobrando a cada ciclo), ou seja, 100%, no entanto, foram considerados satisfatórios valores entre 80 e 110%.

A amplificação foi conduzida em incubações iniciais a 50°C por 2 min, 95°C por 2 min e seguidas de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 62°C por 30 seg (para o conjunto de *primers* EF1- α) e 60°C por 30 seg (para os outros conjuntos de *primers*), com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. Após a termociclagem, uma curva de desnaturação foi obtida entre 72°C e 95°C, determinando as curvas de dissociação de cada produto amplificado.

A aquisição dos dados foi efetuada utilizando-se o programa RotorGene 3000 Real-Time Analysis 6.0, Corbett Research[®], o qual forneceu os valores de ciclo-limite de leitura (CT, do inglês “Cycle Threshold”), eficiência da PCR e R^2 , sendo que se definiu o valor de 0.1 para o “threshold” (piso de fluorescência) de cada corrida.

4.3 Resultados e Discussão

Foi realizada a extração de RNA total a partir de tecido foliar de todos os biótipos de *C. bonariensis* a serem analisados: resistentes e suscetíveis à ação do glyphosate tendo sido tratados e não tratados com o herbicida (Figura 4.1).

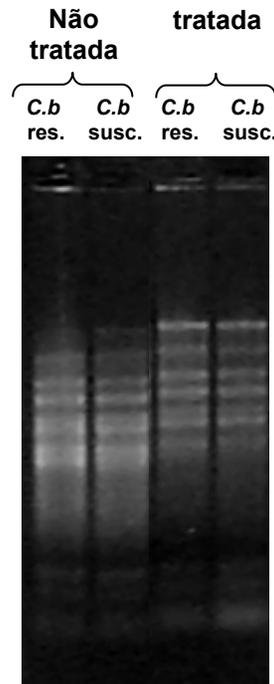


Figura 4.1 - Gel 1,2% agarose contendo fragmentos de RNA extraído de tecidos dos diferentes biótipos de *C. bonariensis* (*C.b* na figura). **res.:** resistente; **susc.:** suscetível.

Diferentes reações de RT-PCR foram preparadas para analisar a amplificação de trecho do cDNA dos genes alvo de estudo (*EF1- α* , *EPSPS1*, *EPSPS2* e *EPSPS3*). Essas reações testariam a qualidade dos cDNAs sintetizados e também a especificidade dos *primers* sobre seu alvo de amplificação (amplificação de fragmentos únicos). Para tanto, cada amostra de cDNA sintetizada a partir dos mRNAs extraídos foi submetida separadamente a reações com os diferentes conjuntos de *primers* desenhados (Tabela 4.1).

A Figura 4.2, apresenta resultados de reação de PCR utilizando os *primers* (EF1alfa_F e EF1alfa_R) desenhados para amplificação do cDNA do gene *EF1- α* .

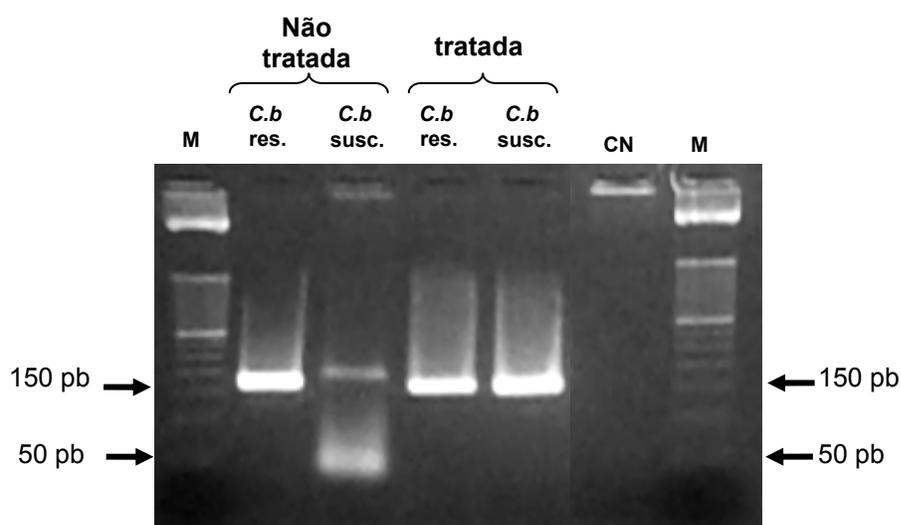


Figura 4.2 - Gel 2% agarose contendo fragmentos de cDNA de *C. bonariensis* obtidos através de reação de PCR para o gene *EF1- α* . **M**: marcador de peso molecular de 50 pb (Invitrogen). **CN**: controle negativo. Todas as amostras apresentaram amplificação de fragmentos de aproximadamente 150 pb, o que era esperado

Os fragmentos amplificados a partir do cDNA gene *EF1- α* deveriam apresentar aproximadamente 150 pb. A eletroforese representada pela Figura 4.2 mostra que todas as amostras de cDNA apresentaram amplificação esperada, o que indica que os *primers* que haviam sido desenhados sobre a seqüência de *Arabidopsis thaliana* são eficazes para a utilização em *C. bonariensis*. A especificidade desse conjunto de *primers* também foi comprovada através do resultado do seqüenciamento dos fragmentos gerados. Os fragmentos obtidos apresentaram similaridade com o gene *EF1- α* (AK221176) de *A. thaliana* (Anexos B.1, B.2 e B.3).

A reação que utilizou os *primers* EPSP1_2_F e EPSP1_R (responsável pela amplificação de trecho do cDNA do gene *EPSPS1*) também foi realizada com êxito (Figura 4.3).

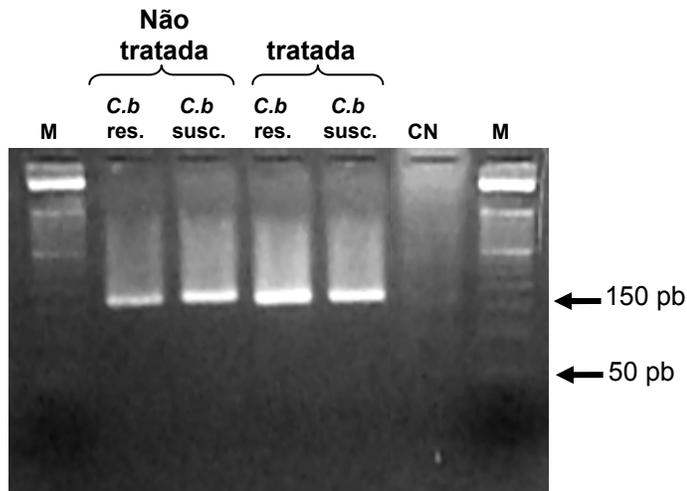


Figura 4.3 - Gel de 2% agarose contendo fragmentos de cDNA de *C. bonariensis* obtidos através de reação de PCR para o gene *EPSPS1* com os *primers* EPSP1_2_F e EPSP1_R. **M**: marcador de peso molecular de 50 pb (Invitrogen). **CN**: controle negativo. Todas as amostras apresentaram amplificação de fragmentos de aproximadamente 150 pb, o que era esperado

Todas as amostras apresentaram amplificação de aproximadamente 150 pb, esperada para essa situação. A especificidade desse conjunto de *primers* também foi confirmada através do seqüenciamento dos fragmentos gerados, que apresentaram similaridade com a seqüência do gene *EPSPS1* (AY545666) de *C. canadensis*, seqüência sobre a qual os *primers* foram desenhados.

Os experimentos realizados com os *primers* EPSPS1_2_F e EPSPS2_R, projetados para viabilizarem a amplificação de trecho do cDNA do gene EPSPS2 não obtiveram resultado esperado (dados não mostrados). Foi constatado que esse par de *primers* não apresentou a especificidade necessária para poder ser utilizado na condução dos experimentos seguintes (RT-qPCR). Dessa forma a análise desse gene com esse par de *primers* não foi levada adiante.

As seqüências os *primers* EPSP2art-F e EPSP2art-R derivam do artigo de Dinelli et al. (2006). Teoricamente esses *primers* deveriam ser responsáveis por amplificar apenas seqüência (816 pb) do cDNA do gene *EPSPS2*. Mas, foi verificado que uma região do gene *EPSPS3* também poderia ser alvo de amplificação por EPSP2art-F e

EPSP2art-R (Anexo C). Os testes de amplificação realizados com esses *primers* até então não apresentaram amplificação de fragmentos de 800 pb (referentes à seqüência do cDNA de *EPSPS2*), mas apresentaram amplificação de fragmentos de aproximadamente 200 pb (que teoricamente se referem à seqüência do cDNA do gene *EPSPS3*) (Figura 4.4).

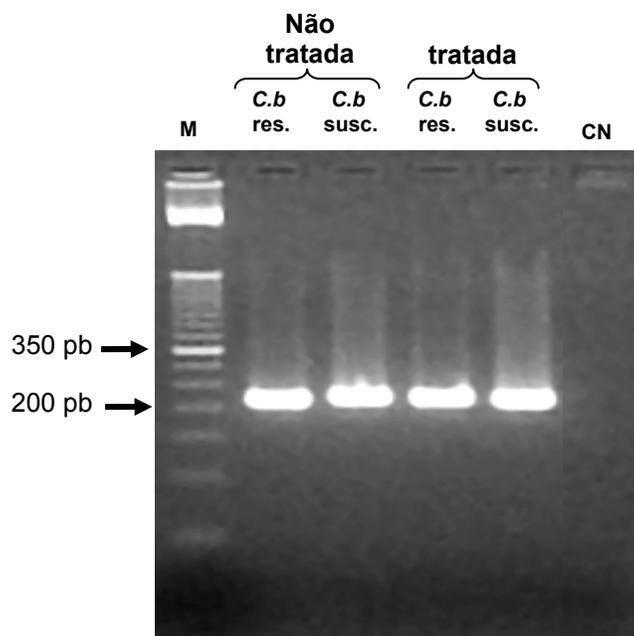


Figura 4.4 - Gel 2% agarose contendo fragmentos de cDNA de *C. bonariensis* obtidos através de reação de PCR com os *primers* EPSP2art_F e EPSP2art_R, apresentando amplificação prevista apenas para região do gene *EPSPS3* (aprox. 200 pb). **M**: marcador de peso molecular de 50 pb (Invitrogen). **CN**: controle negativo

Por outro lado o resultado da análise do seqüenciamento dos fragmentos gerados por essa reação indicou que as seqüências apresentavam trechos de similaridade tanto com o gene *EPSPS2* (AY545667) quanto com o gene *EPSPS3* (AY545668) de *C. canadensis*. Uma comparação entre as seqüências dos genes depositadas no GenBank mostrou que *EPSPS3* apresenta quase total similaridade com trechos de *EPSPS2* (Anexo B) (somente as regiões das seqüências que incluíam os sítios de ligações dos *primers* estão apresentadas em anexo).

Ainda em relação ao gene *EPSPS3*, foi obtido êxito nas reações de PCR utilizando os *primers* EPSP3_F e EPSP3_R (desenhados especificamente para amplificarem uma região de 154 pb do cDNA desse gene). A Figura 4.5 abaixo apresenta resultado de eletroforese em gel de uma dessas reações.

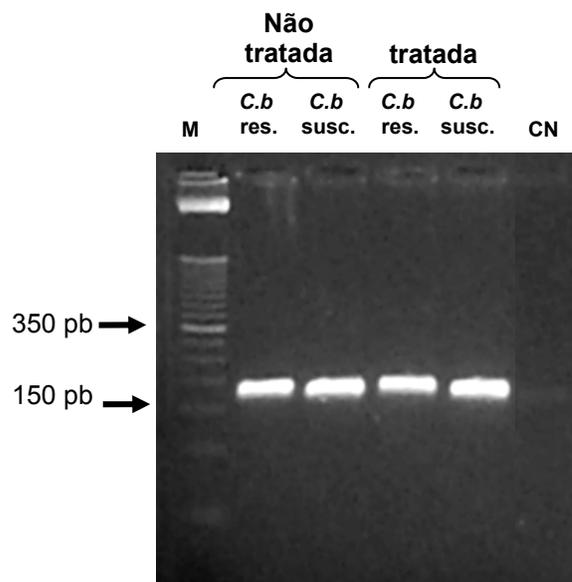


Figura 4.5 - Gel de 2% agarose contendo fragmentos de cDNA de *C. bonariensis* obtidos através de reação de PCR com os *primers* EPSP3_F e EPSP3_R, apresentando amplificação de fragmentos de aproximadamente 150 pb. **M**: marcador de peso molecular de 50 pb (Invitrogen). **CN**: controle negativo

Os fragmentos gerados com essas reações de PCR também apresentaram seqüências similares tanto à região do gene *EPSPS2* quanto a região do gene *EPSPS3* de *C. canadensis* (Anexo B).

Não foi possível determinar sobre qual transcrito os pares de *primers* EPSPS2art_F e EPSPS2art_R e EPSPS3_F e EPSPS3_R se anelavam para viabilizarem as ampliações dos fragmentos, se sobre fragmentos de *EPSPS2* ou *EPSPS3* ou se sobre ambos. Até então também não houve descrições na literatura que indicassem que *EPSPS2* e *EPSPS3* possam se referir a genes distintos. Por outro lado, as comparações realizadas nesse trabalho entre as seqüências mostram um forte vínculo entre *EPSPS2* e *EPSPS3*. Dessa forma, para as análises seguintes de RT-

qPCR assumiu-se que *EPSPS2* e *EPSPS3* se referiam ao mesmo gene e conseqüentemente ao mesmo transcrito presente nas amostras analisadas (chamado de *EPSPS2/EPSPS3*).

Em geral foi constatado que os *primers* desenhados a partir das seqüências dos genes *EPSPS* de *C. canadensis* foram capazes de amplificar seqüências de *EPSPS* de *C. bonariensis*. As análises das seqüências dos fragmentos gerados indicaram forte similaridade entre os genes *EPSPS* de *C. canadensis* e *C. bonariensis* (e com *A. thaliana* no caso do gene *EF1- α*), o que sugere, particularmente baseado nessas comparações, que esses genes são evolutivamente conservados entre essas espécies. Foi constatado que os *primers* testados também apresentaram a especificidade necessária para serem utilizados nos experimentos de RT-qPCR, uma vez que proporcionaram a amplificação apenas de fragmentos únicos (exceto o par *EPSPS1_2_F* e *EPSPS2_R*).

Todos os experimentos realizados também ajudaram a atestar a viabilidade dos cDNAs sintetizados a partir dos RNAs mensageiros extraídos dos tecidos dos biótipos analisados, possibilitando sua utilização nos experimentos de RT-qPCR.

Após confirmada a viabilidade dos cDNAs sintetizados e dos *primers* desenhados, via reações de RT-PCR, foi realizado o delineamento dos experimentos das análises de RT-qPCR para análise da expressão gênica. Inicialmente foram realizadas reações com *pool* de cDNA das amostras objetivando encontrar as melhores condições para se obter os reais valores de eficiência dos *primers*. Os conjuntos de *primers* submetidos às reações foram *EF1alfa_F* e *EF1alfa_R* (gene *EF1- α*), *EPSP1_2_F* e *EPSP1_R* (gene *EPSPS1*), *EPSPS2art_F* e *EPSPS2art_R* (gene *EPSPS2/EPSPS3*), e *EPSP3_F* e *EPSP3_R* (gene *EPSPS2/EPSPS3*). Em seguida foram conduzidas reações com cada amostra de cDNA (*C. bonariensis* resistente e suscetível submetidas ou não ao tratamento com glyphosate para que fosse possível realizar as análises de expressão dos genes. A Tabela 4.2 apresenta a seguir os valores de eficiência obtidos para cada par de *primers* submetido aos testes.

Tabela 4.2 - Valores de eficiência obtidos para pares de *primers* submetidos aos experimentos de RT-qPCR

Nome do <i>primer</i> (gene)		Valor de eficiência obtido (somado a 1)
EPSP1_2_F EPSP1_R	(EPSPS1)	2,008
EPSP2art_F EPSP2art_R	(EPSPS2/EPSPS3)	1,805
EPSP3_F EPSP3_R	(EPSPS2/EPSPS3)	2,060
EF1alfa_F EF1alfa_R	(EF1 α)	2,000

O Anexo D apresenta as curvas de “melting” das reações realizadas. Fragmentos específicos foram amplificados em todas as situações.

Os dados foram analisados de acordo com Pfaffl (2001). A Figura 4.6 abaixo apresenta gráfico que mostra os níveis relativos de expressão de cada gene analisado para cada amostra. A amostra calibradora, que serve de base para as comparações foi escolhida arbitrariamente entre as amostras, no caso *C. bonariensis* suscetível não submetida ao tratamento com glyphosate (“Cb S n trat” na figura).

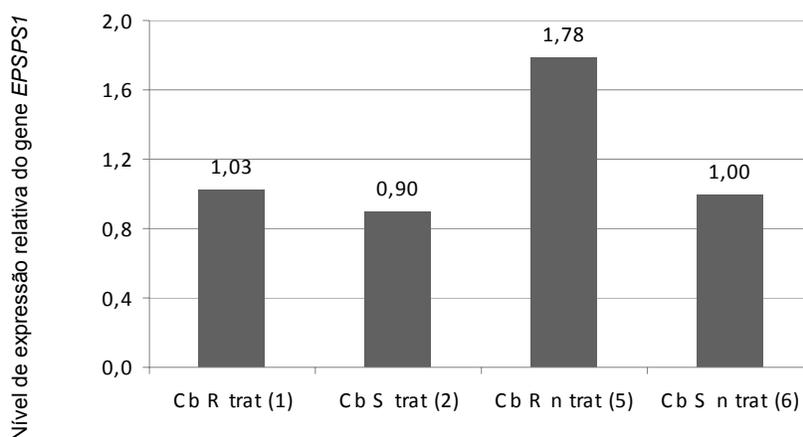


Figura 4.6 - Expressão gênica relativa de *EPSPS1* em tecidos de *C. bonariensis* resistente (**Cb R**) ou suscetível (**Cb S**) submetidos (**trat**) ou não (**n trat**) ao tratamento com glyphosate

A análise dos dados apresentados nesse gráfico permite propor que a expressão do gene *EPSPS1* em *C. bonariensis* possa estar relacionada à condição de resistência da planta ao tratamento com glyphosate. Nos biótipos resistentes (na figura, 'Cb R n trat' e 'Cb R trat') o nível de expressão gênica aparece sempre maior em relação ao nível de expressão dos biótipos suscetíveis (na figura, 'Cb S n trat' e 'Cb S trat'). Também é observado que ocorre uma queda na produção de transcritos desse gene após 24 horas da aplicação do herbicida glyphosate, mas ainda assim o biótipo resistente apresenta maior nível de expressão se comparado ao biótipo suscetível.

A Figura 4.7 apresenta diferentes formas de comparação do nível de expressão de *EPSPS1*, tendo como base sempre os mesmos dados. Para cada caso alterou-se apenas a amostra utilizada como calibradora. As relações observadas continuam as mesmas.

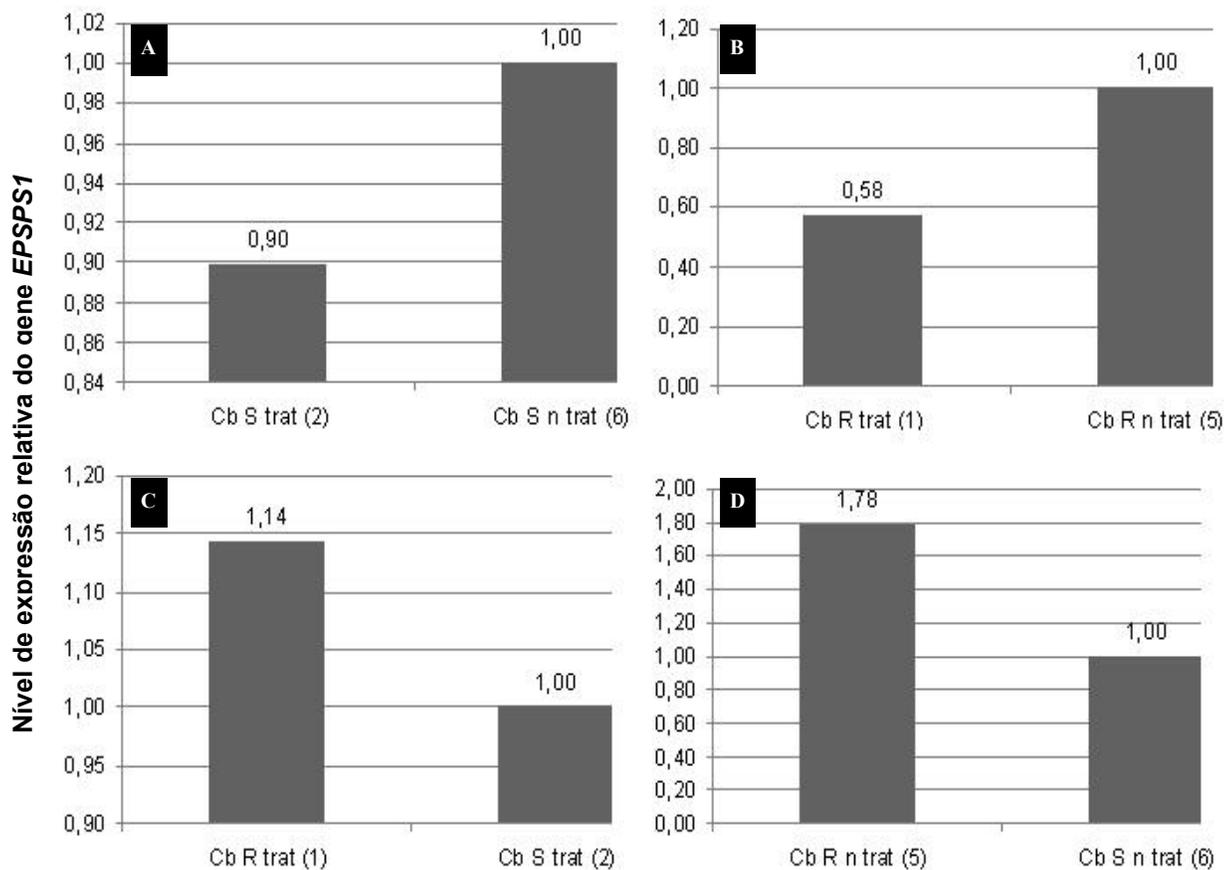


Figura 4.7 – Expressão gênica relativa de *EPSPS1* em tecidos de *C. bonariensis* resistente (**Cb R**) ou suscetível (**Cb S**) submetidos (**trat**) ou não (**n trat**) ao tratamento com glyphosate. Em **A**: comparação entre biótipos suscetíveis com e sem a aplicação de glyphosate. Em **B**: comparação entre biótipos resistentes com e sem a aplicação de glyphosate. Em **C**: comparação entre biótipos resistente e suscetível, ambos submetidos à aplicação de glyphosate. Em **D**: comparação entre biótipos resistente e suscetível, ambos não submetidos à aplicação de glyphosate

A Figura 4.8 abaixo apresenta o resultado da análise da expressão do gene *EPSPS2/EPSPS3* (analisado duplamente devido aos dois conjuntos de *primers* utilizados). A amostra calibradora utilizada novamente foi *C. bonariensis* suscetível sem tratamento com glyphosate (“Cb S n trat” na figura).

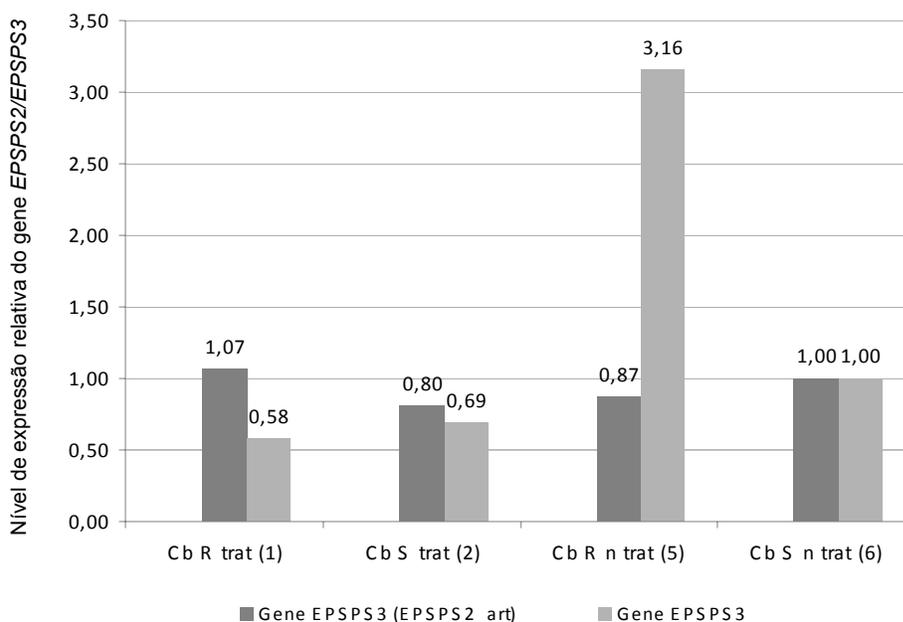


Figura 4.8 - Expressão gênica relativa de *EPSPS2/EPSPS3* (analisado duplamente pelos dois pares de *primers* EPSPS2_art e EPSPS3) em tecidos de *C. bonariensis* resistente (**Cb R**) ou suscetível (**Cb S**) submetidos (**trat**) ou não (**n trat**) ao tratamento com glyphosate

A mesma relação observada em relação a *EPSPS1* pode ser observada para o gene *EPSPS2/EPSPS3* (somente a partir da interpretação dos dados providos da utilização do conjunto de *primers* EPSPS3_F e EPSPS3_R), ou seja, é possível que um alto nível de expressão basal do gene *EPSPS2/EPSPS3* também possa ser em parte responsável por conferir a resistência à ação do glyphosate em *C. bonariensis*. Aparentemente o nível de expressão do transcrito desse gene também diminui após submeter ambos os biótipos ao tratamento com o herbicida.

Era de se esperar que os dados oriundos dos experimentos com *EPSPS2/EPSPS3* com os diferentes pares de *primers* apresentassem resultados equivalentes, uma vez que ambos os pares de *primers* deveriam se ligar sobre o mesmo transcrito (a análise das curvas de “melting” das duas reações (Anexo D) ajudam a confirmar a possibilidade de *EPSPS2* e *EPSPS3* se referirem a um mesmo transcrito). A diferença nos níveis de expressão observados entre as reações se deve possivelmente aos diferentes valores de eficiência encontrados de cada conjunto de *primer*. Valores

muito distantes como os obtidos (Tabela 4.2) podem ajudar a alcançar resultados discrepantes quando comparados.

Todas as análises realizadas com os genes *EPSPS* de *C. bonariensis* foram feitas uma única vez. Portanto os dados apresentados refletem apenas uma suposição do nível de expressão desses genes. Repetições biológicas devem ser realizadas para confirmar a tendência desses níveis de expressão para assim poder definitivamente atrelar ou não a resistência ao glyphosate com a expressão dos genes *EPSPS* em *C. bonariensis*.

Avaliando o nível de expressão gênica de *EPSPS2* em *C. bonariensis*, Dinelli et al. (2008) também sugeriram que o nível basal dos transcritos em biótipos resistentes de *C. bonariensis* eram de 2-3 vezes mais altos que aqueles observados nos biótipos susceptíveis (antes da aplicação de glyphosate) e que esse fato, aliado com a forma de translocação do glyphosate nessa espécie, ajudam a diminuir a inibição de *EPSPS* pelo herbicida.

Estudos já realizados com *C. canadensis* também acusam um maior nível de expressão do mRNA de *EPSPS2* (2-3 vezes) em biótipos resistentes sem tratamento com glyphosate, corroborando os dados apresentados. Em *C. canadensis* a síntese de transcritos *EPSPS* não foi induzida em resposta aplicação do herbicida (DINELLI et al., 2006).

Outros trabalhos já haviam estudado a relação entre expressão de *EPSPS* e resistência ao tratamento com glyphosate em outras espécies. Na primeira espécie em que foi detectada a resistência ao herbicida, *Lolium rigidum*, estudos indicaram que mecanismos baseados na enzima *EPSPS* não estavam envolvidos com a resistência ao glyphosate (BAERSON et al., 2002; LORRAINE-COLWILL et al., 2001; FENG et al., 1999; LORAINNE-COLWILL et al., 1999). Ao contrário, em *Dicliptera chianensis* o aumento do nível de *EPSPS* em tecidos da planta foi citado como um dos três tipos de mecanismos responsáveis por conferir resistência ao herbicida (YUAN; CHAING; CHEN, 2002). Em *Eleusine indica*, espécie que também apresenta biótipos resistentes, foi constatado que a resistência está relacionada a uma mutação na seqüência de *EPSPS*, que alterou um aminoácido importante situado no sítio de ligação entre a enzima e o herbicida (NG et al., 2003; BAERSON et al., 2002). Dinelli et al. (2008) também sugerem

a possibilidade de uma mutação pontual no sítio alvo de *EPSPS* estar relacionada à resistência em *C. bonariensis*. Mas, de acordo com o revisado por Powles e Preston (2006), é importante enfatizar que não é válido extrapolar que a resistência ao glyphosate poderá sempre ser relacionada a mutações no sítio de ação da enzima ou a outras mutações em geral.

4.4 Conclusões

- É possível concluir que existe alto grau de similaridade entre as seqüências obtidas dos genes *EPSPS* de *C. bonariensis* e as seqüências de *C. canadensis* depositadas no GenBank.
- Além disso, pode-se sugerir que há relação entre a expressão dos genes *EPSPS* em *C. bonariensis* e a condição de resistência à ação do herbicida glyphosate em alguns indivíduos dessa espécie uma vez que foi observado que o nível de expressão de *EPSPS* é geralmente maior em indivíduos resistentes.
- Após 24 horas, a aplicação do glyphosate promove uma queda no nível de expressão desse gene, tanto em indivíduos resistente como suscetíveis.

Referências

BAERSON, S.R.; RODRIGUEZ, D.J.; TRAN, M.; FENG, Y.; BEST, N.A.; DILL, G.M. Glyphosate-resistant goosegrass: identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 129, p. 1265–1275, 2002.

BRODY, J.R.; CALHOUN, E.S.; GALLMEIER, E.; CREAVALLE, T.D.; KERN, S.E. Ultra-fast high-resolution agarose electrophoresis of DNA and RNA using low-molarity conductive media. **Biotechniques**, v. 37, n. 4, p. 598, 600, 602, 2004.

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

_____. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Coord.). **Aspectos de resistência das plantas daninhas a herbicidas**. 3. ed. Campinas: HRAC-BR, 2008. p. 9-34.

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**, Lawrence, v. 48, p. 257–265, 2008.

DINELLI, G.; MAROTTI, I.; BONETTI, A.; MINELLI, M.; CATIZONE, P.; BARNES, J. Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. Biotypes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 86, p. 30–41, 2006.

FENG, P.C.C.; PRATLEY, J.E.; BOHN, J.A. Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. II. Uptake, translocation, and metabolism. **Weed Science**, Ithaca, v. 47, p. 412–415, 1999.

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

GEIGER, D.R.; FUCHS, M.A. Inhibitors of aromatic amino acid biosynthesis (glyphosate). In: BÖGER, P.; WAKABAYASHI, K.; HIRAI, K. (Ed.). **Herbicide classes in development**. Berlin: Springer-Verlag, 2002. p. 59-85.

JASIENIUK, M.; AHMAD, R.; SHERWOOD, A.M.; FIRESTONE, J.L.; PEREZ-JONES, A.; LANINI, W.T; MALLORY-SMITH, C. and STEDNICK, Z. Glyphosate-resistant italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in california: Distribution, response to glyphosate, and molecular evidence for an altered target enzyme. **Weed Science**, Lawrence, v. 56, p. 496-502, 2008.

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

LORRAINE-COLWILL, D.F.; POWLES, S.B.; HAWKES, T.R.; PRESTON, C. Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, p. 545-550, 2001.

LORRAINE-COLWILL, D.F.; POWLES, S.B.; HAWKES, T.R.; HOLLINSHEAD, P.H.; WARNER, A.J.; PRESTON, C. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. New York, v. 74, n. 1, p. 62–72, 2003.

LORRAINE-COLWILL, D.F.; HAWKES, T.R.; WILLIAMS, P.H.; WARNER, S.A.J.; SUTTON, P.B.; POWLES, S.B.; PRESTON, C. Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. **Pesticide Science**. Washington, v. 55, n. 3, p. 489–491, 1999.

MUELLER, T.C., MASSEY, J.H., HAYES, R.M., MAIN, C.L., STEWART, C.N. Shikimate accumulates in both glyphosate-sensitive and glyphosate resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 680–684, 2003

NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI. Interações entre glyphosate e adubos foliares sobre parâmetros agronômicos do herbicida. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE, 1., 2007. Botucatu. **Resumos...** Botucatu: Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, 2007. p.39.

NG, C.H.; WICKNESWARI, R.; SALMIJAH, S.; TENG, Y.T.; ISMAIL, B.S. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and –susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. **Weed Research**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 108–115, 2003.

_____. Glyphosate resistance in *Eleusine indica* (L) Gaertn from different origins and polymerase chain reaction amplification of specific alleles. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 55, p. 407-414, 2004.

PEREZ-JONES, A; PARK, K.W.; POLGE, N.; COLQUHOUN, J.; MALLORY-SMITH, C.A. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. **Planta**, Berlin, v. 226, n. 2, p. 395-404, 2007.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 1, p. 29-45, 2001.

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

SIEHL, D.L. Inhibitors of EPSP synthase, glutamine synthetase and histidine synthesis. In: ROE, R.M.; BURTON, J.D.; KUHR, R.J. (Ed.). **Herbicide activity: toxicology, biochemistry and molecular biology**. Amsterdam: IOS, 1997. p. 37-67.

VANGESSEL, M.J. Glyphosate resistant horseweed from Delaware. **Weed Science**, Lawrence, v. 49, n. 2, p. 703-705, 2001.

YUAN, C.I.; CHAING, M.Y.; CHEN, Y.M.. Triple mechanisms of glyphosate-resistance in a naturally occurring glyphosate-resistant *Dicliptera chinensis*. **Plant Science**, Limerick, v. 163, p. 543–554, 2002.

5 ALTERNATIVAS DE CONTROLE DE *Conyza bonariensis* e *C. canadensis* RESISTENTES AO GLYPHOSATE EM POMARES CÍTRICOS

Resumo

Um dos herbicidas mais utilizados para o controle de plantas daninhas em pós-emergência nos pomares cítricos paulistas é o glyphosate. No entanto, este herbicida aplicado isoladamente e nas doses recomendadas, tem proporcionado seleção de biótipos resistentes da planta daninha buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*) devido à pressão de seleção somada à boa adaptabilidade ecológica das espécies a sistemas conservacionistas de manejo de solo. O presente experimento teve por objetivo avaliar alternativas químicas de controle para buva (*C. bonariensis* e *C. canadensis*) resistente ao herbicida glyphosate em pomares cítricos do Estado de São Paulo. O experimento foi realizado em campo na Fazenda Cambuhy, município de Matão-SP, no período compreendido entre maio e agosto de 2008. O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados, com quinze tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos herbicidas utilizados em g i.a. ha⁻¹ foram: amônio-glufosinato (400), amônio-glufosinato (500), amônio-glufosinato + espalhante adesivo (400 + 0,5% v/v), amônio-glufosinato + espalhante adesivo (500 + 0,5% v/v), amônio-glufosinato + glyphosate (400 + 1440), amônio-glufosinato + metribuzin (400 + 960), glyphosate + metribuzin (1440 + 960), glyphosate (1440), glyphosate + diuron (1440 + 1200), glyphosate + diuron (1440 + 2000), glyphosate + [atrazine + simazina] (1440 + 625), glyphosate + flumioxazin (1440 + 150), amônio-glufosinato + diuron (400 + 1200), amônio-glufosinato + diuron (400 + 1600) e testemunha sem aplicação. Foram feitas avaliações visuais de sintomas de fitotoxicidade provocados pelos herbicidas aos 14, 28 e 44 dias após aplicação (DAA). Os resultados mostraram que os tratamentos com o herbicida amônio-glufosinato foram mais eficientes no controle de buva. A mistura deste herbicida com os herbicidas metribuzin ou diuron prolongou o controle por mais de 60 dias após a aplicação.

Palavras-chave: Buva; Inibidores da EPSPS; Citros; Manejo

Abstract

The aim of this study was to evaluate the alternatives of control for hairy fleabane and horseweed (*Conyza bonariensis* e *C. canadensis*) resistant to herbicide glyphosate in orange orchards from Sao Paulo state. The experiment was conducted at Cambuhy farm located in Matão-São Paulo state during May to July, 2008. The experimental design adopted was randomized blocks, with fifteen treatments and four replicates. The herbicides employed in the treatments in g a.i ha⁻¹ were: ammonium-glufosinate (400), ammonium-glufosinate (500), ammonium-glufosinate + surfactant (400 + 0.5% v/v), ammonium-glufosinate + surfactant (500 + 0.5% v/v); ammonium-glufosinate +

glyphosate (400 + 1440); ammonium-glufosinate + metribuzin (400 + 960); glyphosate + metribuzin (1440 + 960), glyphosate (1440); glyphosate + diuron (1440 + 1200); glyphosate + diuron (1440 + 2000), glyphosate + [atrazine + simazine] (1440 + 625), glyphosate + flumioxazin (1440 + 150), ammonium glufosinate + diuron (400 + 1200) e amônio ammonium glufosinate + diuron (400 + 1600) and checks without application. Visual evaluation of phytotoxicity caused by the herbicides at 14, 28 and 44 days after application (DAA) were done. The results showed that the treatments containing ammonium glufosinate were more efficient in horseweed and hairy fleabane control. The mixture of this herbicide with metribuzin or diuron postponed the control for more than 60 days after the application.

Keywords: Horseweed; Hairy fleabane; EPSP synthase-inhibitors; Chemical management

5.1 Introdução

Atualmente, são empregados vários métodos de controle das plantas daninhas na cultura do citros, evitando-se a competição e facilitando-se os tratos culturais (MARTINI, 2002). O uso de herbicidas destaca-se por ser o mais eficiente e rápido, disponibilizando a mão-de-obra na propriedade. Caetano (2000) afirma que o uso de herbicidas proporcionou redução na infestação das plantas daninhas em relação à gradagem e roçagem. Dentre os herbicidas aplicados em pós-emergência, os mais conhecidos entre os citricultores é o glyphosate (MARTINI, 2002).

A intensa utilização de glyphosate nas áreas citrícolas do Estado de São Paulo favorece o aumento da pressão de seleção, que, aliada à boa adaptabilidade ecológica das espécies de buva (*Conyza canadensis* e *Conyza bonariensis*) a sistemas conservacionistas de manejo de solo, contribui para a seleção de biótipos resistentes dessas espécies (MOREIRA et al., 2007).

C. canadensis e *C. bonariensis* (buvas) são espécies originárias dos Estados Unidos (WEAVER et al., 2001), pertencentes à família Asteraceae, possuindo ciclo de desenvolvimento anual. São espécies extremamente prolíficas, podendo produzir até 200.000 sementes viáveis por planta, estabelecendo-se em diversas condições climáticas.

No Brasil, é freqüente a ocorrência de ambas as espécies de buva associadas, as quais apresentam adaptabilidade ecológica em sistemas conservacionistas, como

semeadura direta e cultivo mínimo de solo (LAZAROTTO; FLECK; VIDAL, 2008). A habilidade de auto-polinização da espécie aliada a grande produção de sementes facilmente dispersáveis são fatores que podem contribuir para a boa adaptabilidade ecológica, para a sobrevivência de biótipos resistentes de buva e para as altas infestações nos sistemas conservacionistas de solo (CHRISTOFFOLETI; MOREIRA, 2008).

Dentre as principais conseqüências da resistência de plantas daninhas a herbicidas podemos enumerar a restrição ou inviabilização da utilização desses produtos, perdas de áreas de plantio, perdas de rendimento e qualidade dos produtos das culturas agrícolas, necessidade de reaplicação de herbicidas, mudanças no sistema de produção e, em alguns casos, requerendo aumento de doses dos herbicidas, que tem como conseqüência maior impacto ambiental e elevação dos custos de produção, com conseqüente redução da competitividade na comercialização do produto final (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2008). Quando ocorrem plantas daninhas resistentes aos herbicidas em uma área, com densidade suficiente para limitar a produção das culturas agrícolas, há necessidade de mudanças nas práticas de manejo utilizadas. Portanto, é necessário alterar constantemente as práticas normalmente utilizadas para o controle de plantas daninhas, visando evitar ou retardar o aparecimento de plantas daninhas resistentes (LÓPEZ-OVEJERO et al., 2008).

Segundo López-Ovejero et al. (2006), a mudança mais comum, adotada pelos agricultores em áreas onde foram detectados biótipos de plantas daninhas resistentes, é a adição de herbicidas alternativos, aplicados de forma isolada ou misturados em tanque com aqueles herbicidas para os quais foi detectada a resistência. No entanto, para Powles e Holtum (1994), a alternativa de mistura de herbicidas no tanque de pulverização, bem como o uso de misturas formuladas ou aplicações seqüenciais de herbicidas para manejo e prevenção da resistência, está baseada no fato de que os ingredientes ativos controlam eficientemente os dois biótipos da mesma espécie, ou seja, o biótipo resistente a um dos herbicidas é controlado pelo outro ingrediente ativo da mistura.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar herbicidas alternativos para o controle de biótipos resistentes ao herbicida glyphosate em populações de *C. canadensis* e *C. bonariensis* em pomares de citros do estado de São Paulo.

5.2 Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido na Fazenda Cambuhy, pertencente ao Grupo Cambuhy Agrícola LTDA, em Matão – SP – Brasil (latitude 21°36'12" sul, longitude 48°21'57" oeste a 585 metros de altitude), no período compreendido entre Maio e Agosto de 2008. O experimento foi instalado em um pomar de Valência x Swingle em espaçamento de 6,50 x 2,80 m plantado em 2006.

O solo foi classificado como sendo um Argissolo de textura arenosa, pH 4,9, com 20 g dm⁻³ de matéria orgânica e 25,8 mmol_cdm⁻³ de saturação por bases. A análise química e física do solo utilizado nos experimentos está apresentada na Tabela 5.1. Considerou-se a área como densamente infestada por buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*), em estágio fenológico de pleno florescimento (BBCH 51) em escala discutida por Hess et al. (1997), caracterizada como a espécie dominante. A densidade de buvas na área foi de 30 plantas m².

Tabela 5.1 - Propriedades químicas e físicas* do solo da área experimental. Classe textural - arenosa. Matão - SP, 2008

Propriedades Químicas								
pH	M.O	P resina	K	Ca	Mg	H+Al	CTC	V
CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³			mmol _c dm ⁻³			%
4,3	20	18	1,8	17	7	22	48,3	53
Propriedades Físicas								
Argila		Silte		Areia Total		Areia Grossa		Areia Fina
< 0,002 mm		0,053-0,002 mm				2,00 - 0,210 mm		0,210 - 0,053mm
				g kg ⁻¹				
14,6		0,8		84,6		6,5		78,1

* Dados fornecidos pela Fazenda Cambuhy

O delineamento experimental adotado foi do tipo blocos ao acaso, constando de quatro repetições e quinze tratamentos, totalizando sessenta parcelas. Cada parcela experimental foi constituída por quatro plantas, totalizando uma área de 72,8 m², sendo que a bordadura foi caracterizada por uma planta.

A aplicação dos herbicidas foi realizada no dia 19 de maio de 2008, das 10:45 às 12:00 h. No momento das aplicações, os parâmetros meteorológicos médios foram: UR (%) de 60%; T (°C) de 26 °C; céu aberto e ventos de 2,0 km h⁻¹. Utilizou-se pulverizador costal pressurizado por CO₂, acoplado a uma barra de pulverização com largura útil de 2 m, com quatro pontas do tipo leque Teejet TT, XR 110.02, espaçadas em 0,50 m, calibrado para um volume de calda proporcional a 200 L ha⁻¹ o que corresponde a uma pressão de trabalho de 23 lb pol⁻².

As variáveis avaliadas foram: porcentagem de controle da planta daninha *Conyza* spp. aos 14, 28 e 44 dias após a aplicação (DAA). As notas de porcentagem de controle foram atribuídas através de notas percentuais em relação à testemunha, oscilando entre 0%, que corresponde à ausência de sintomas fitotóxicos, e 100%, correspondente a morte da planta.

Todos os dados foram submetidos à aplicação do teste 'F' na análise da variância. Quando se identificou efeito de níveis de tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de 'Tukey' a 5% de probabilidade.

5.3 Resultados e Discussão

As precipitações, vento, umidade relativa média e temperatura média do período que o experimento esteve em campo são apresentadas na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Precipitações (mm), umidade relativa média (U.R.M.) em porcentagem (%) e Temperatura média (T.M.) em °C, observadas durante o período de condução do experimento. Matão - SP, 2008

Ano de 2008	Precipitação (mm)	Evapotranspiração	U.R.M. ¹ (%)	Temperatura	
				Máxima (°C)	Mínima
Maio	64,4	67,8	61,7	33,0	9,0
Junho	12,4	90,1	62,6	27,9	3,0
Julho	0,0	80,7	56,0	34,0	6,0

¹ Umidade Relativa Média; * - Dados fornecidos pela Fazenda Cambuhy

Os herbicidas selecionados estão descritos na tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Tratamentos herbicidas aplicados no experimento. Matão - SP, 2008

Nome Comum	Herbicidas Nome comercial	Dose	
		L ou kg ha ⁻¹ p.c. ¹	g ha ⁻¹ de i.a. ²
Testemunha sem capina	-	-	-
Amônio-Glufosinato	Finale	2	400
Amônio-Glufosinato	Finale	2,5	500
Amônio-Glufosinato*	Finale*	2 + 0,5% v/v	400 + 0,5% v/v
Amônio-Glufosinato*	Finale*	2,5 + 0,5% v/v	500 + 0,5% v/v
Amônio-Glufosinato + glyphosate	Finale + Roundup Original	2 + 4	400 + 1440
Amônio-Glufosinato + metribuzin	Finale + Sencor	2 + 2	400 + 960
Glyphosate + metribuzin	Roundup Original + Sencor	4 + 2	1440 + 960
Amônio-Glufosinato + diuron	Finale + Karmex	2 + 1,5	400 + 1200
Amônio-Glufosinato + diuron	Finale + Karmex	2 + 2	400 + 1600
Glyphosate	Roundup Original	4	1440
Glyphosate + diuron	Roundup Original + Karmex	4 + 1,5	1440 + 1200
Glyphosate + diuron	Roundup Original + Karmex	4 + 2,5	1440 + 2000
Glyphosate + (atrazine + simazina)	Roundup Original + (atrazine + simazina)	4 + 2,5	1440 + 625 + 625
Glyphosate + Flumioxazin	Roundup Original + Flumizim 500	4 + 0,3	1440 + 150

¹ produto comercial; ² ingrediente ativo. *espalhante adesivo (Áureo 0,5%).

A aplicação do teste F sobre a análise da variância para os dados avaliados indicou significância (5%) para os tratamentos herbicidas.

Na Tabela 5.4, observa-se que aos 14 DAA os tratamentos com amônio-glufosinato apresentaram controles considerados excelentes superiores a 98%. Para os tratamentos com amônio-glufosinato + metribuzin (400 + 960) e amônio-glufosinato + diuron (400 + 1600) apresentaram controles de 100%. Todos os tratamentos com aplicação de glyphosate isolado ou em mistura apresentaram controles inferiores a 80%. O tratamento com glyphosate (1440) apresentou o menor controle para a avaliação aos 14 DAA, com porcentagem de controle de 28,75 %. Estes dados corroboram com os obtidos por Moreira et al. (2007) em que a dose recomendada de glyphosate (720 g ha⁻¹) proporcionou controle da ordem de apenas 30% para as populações com suspeita de resistência. Resultados semelhantes foram encontrados por VanGessel (2001), em que o controle do biótipo resistente foi de apenas 50% na dose de 720 g ha⁻¹.

Tabela 5.4 - Controle percentual de buva após aplicação de 15 tratamentos herbicidas, avaliado aos 14, 28 e 44 dias após aplicação (DAA) - Matão/SP, 2008

Tratamento	Dose g ha ⁻¹ de i.a. ¹	Controle Percentual		
		14 DAA	28 DAA	44 DAA
Testemunha sem capina	-	0,00 f	0,00 c	0,00 d
Amônio-Glufosinato	400	98,75 a	97,75 a	97,00 a
Amônio-Glufosinato	500	99,50 a	97,50 a	96,25 a
Amônio-Glufosinato*	400 + 0,5% v/v	99,50 a	98,25 a	96,50 a
Amônio-Glufosinato*	500 + 0,5% v/v	99,50 a	98,25 a	96,25 a
Amônio-Glufosinato + glyphosate	400 + 1440	99,25 a	97,00 a	94,00 a
Amônio-Glufosinato + metribuzin	400 + 960	100,00 a	100,00 a	100,00 a
Glyphosate + metribuzin	1440 + 960	76,25 b	99,00 a	99,50 a
Amônio-Glufosinato + diuron	400 + 1200	99,75 a	98,00 ab	98,75 a
Amônio-Glufosinato + diuron	400 + 1600	100,00 a	99,50 a	99,50 a
Glyphosate	1440	28,75 e	57,50 b	19,25 cd
Glyphosate + diuron	1440 + 1200	50,00 d	70,00 b	45,00 bc
Glyphosate + diuron	1440 + 2000	57,50 cd	67,50 b	52,50 b
Glyphosate + (atrazine + simazina)	1440 + 625 + 625	71,25 bc	86,25 a	96,25 a
Glyphosate + Flumioxazin	1440 + 150	57,50 cd	58,75 b	52,50 b
	CV (%)	9,37	7,25	15,11
	DMS	18,03	15,03	29,23

¹ ingrediente ativo. *espalhante adesivo (Áureo 0,5%). Médias acompanhadas de letras iguais não diferem segundo teste de 'Tukey' com 5% de significância.

A mistura Glyphosate + atrazine + simazina (1440 + 625 + 625) e Glyphosate + metribuzin (1440 + 960) apresentaram controles insatisfatórios inferiores a 85%.

Aos 28 DAA os tratamentos com Amônio-Glufosinato + espalhante adesivo (400 + 0,5% v/v), Amônio-Glufosinato + espalhante adesivo (500 + 0,5% v/v), Glyphosate + metribuzin (1440 + 960), Amônio-Glufosinato + diuron (400 + 1200), Amônio-Glufosinato + diuron (400 + 1600), Amônio-Glufosinato (400), Amônio-Glufosinato (500), Amônio-Glufosinato + glyphosate (400 + 1440), Amônio-Glufosinato + diuron (400 + 1200) apresentaram controles excelentes acima de 97%, não diferindo entre si pelo teste estatístico (Tabela 5.4).

Glyphosate + diuron (1440 + 1200), Glyphosate + diuron (1440 + 2000), Glyphosate + Flumioxazin (1440 + 150), Glyphosate (1440) apresentaram controles inferiores a 70%, sendo que o herbicida Glyphosate (1440) apresentou o pior controle aos 28 DAA, com nota 57,50% (Tabela 5.4).

Aos 44 DAA os tratamentos com Amônio-Glufosinato, Glyphosate + metribuzin (1440 + 960) e Glyphosate + atrazine + simazina (1440 + 625 + 625) apresentaram controles superiores a 96%, sendo boas alternativas de herbicidas no controle de biótipos resistentes de buva ao glyphosate. Moreira et al (2007) em pesquisa utilizando três populações de *C. canadensis* e *C. bonariensis*, duas coletadas em áreas com suspeita de resistência, no Estado de São Paulo e uma suscetível, coletada em áreas sem histórico de aplicação de glyphosate, concluiu que o glyphosate + metribuzin (1.440 + 480) em g ha⁻¹ foram eficiente para as três populações de cada espécie testadas.

Já os tratamentos com glyphosate, exceto Glyphosate + metribuzin (1440 + 960) e Glyphosate + atrazine + simazina (1440 + 625 + 625), apresentaram controles insatisfatórios, inferiores a 52% (Tabela 5.4). Esses dados corroboram com Christoffoleti et al. (2006) que observou que o glyphosate WG isolado nas doses de 1440, 2160, 2880, 4320, 5760 e 8640 e glyphosate WG em mistura com Imazethapyr nas doses de (1440 + 100) e (1440 + 200) apresentaram controle insatisfatório, inferiores a 64% em experimento em áreas com histórico de escapes de *C. canadensis* e *C. bonariensis* à campo no município de Matão-SP em estágio de florescimento.

5.4 Conclusão

Com a realização deste estudo foi possível concluir que o herbicida com maior eficiência no controle de buva é o amônio-glufosinato. Além disso, a mistura deste herbicida com os herbicidas residuais metribuzin ou diuron prolonga o controle de buva por mais de 60 dias após a aplicação.

Referências

CAETANO, R.S.X. **Dinâmica do banco de sementes e de populações de plantas daninhas na cultura dos citros (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.) submetida a diferentes sistemas de manejo.** 2000. 105 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Resistência de plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Coord.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas.** 3. ed. Piracicaba: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas aos Herbicidas, 2008. p. 9-29.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; MOREIRA, S.M. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da EPSPS (Grupo G). In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Coord.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas.** 3. ed. Piracicaba: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas aos Herbicidas, 2008. p. 78-92.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; MONTEZUMA, M.C.; GALLI, A.J.; SPERANDIO, P.H.; MOREIRA, M.S.; NICOLAI, M. Herbicidas alternativos para o controle de biótipos de buva (*Conyza canadensis*, *Conyza bonariensis*) supostamente resistentes ao herbicida glyphosate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 25., 2006, Brasília. **Resumos expandidos...** Brasília: SBPCPD, 2006. 1 CD-ROM.

HESS, M.; BARRALIS, G.; BLEIHOLDER, H.; BUHR, L.; EGGERS, T.H.; HACK, H.; STAUSS, R. Use of the extended BBCH scale: general for the descriptions of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. **Weed Research**, Lawrence, v. 37, p. 433-441, 1997.

LAZAROTTO, C.A.; FLECK, N.G.; VIDAL, R.A. Biologia e ecofisiologia de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p. 852–860, 2008.

LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CARVALHO, S.J.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Recomendações gerais para manejo integrado de plantas daninhas resistentes a herbicidas In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Coord.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3. ed. Piracicaba: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas aos Herbicidas, 2008. p. 111-114.

LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; PENCKOWSKI, L.H.; PODOLAN, M.J.; CARVALHO, S.J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Alternativas de manejo químico da planta daninha *Digitaria ciliaris* resistente aos herbicidas inibidores da accase na cultura de soja. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, p. 407-414, 2006.

MARTINI, G.; PEDRINHO JUNIOR, A F.; FELICI, G.V.; PIVA, F.M.; DURIGAN, J.C. Eficácia de uma nova formulação de glyphosate para o controle de grama-seda (*Cynodon dactylon*), em pomar de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 24, p. 683-686, 2002.

MOREIRA, M.S.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S.J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Glyphosate-resistance in *Conyza canadensis* and *C. bonariensis*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 83-58. 2007.

POWLES, S.B.; HOLTUM, J.A.M. **Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry**. Boca Raton: Lewis, 1994. 353 p.

VANGESSEL, M.J. Glyphosate resistant horseweed from Delaware. **Weed Science**, Lawrence, v. 49, p. 703-705, 2001.

WEAVER, S.E. The biology of Canadian weeds, *Conyza canadensis*. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 81, n. 5, p. 867-875, 2001.

6 CONCLUSÕES GERAIS

- (i) Apesar de especulativo, através de evidências indiretas, o mecanismo de resistência do biótipo de buva estudado não está relacionado com insensibilidade da EPSPS ao glyphosate;
- (ii) A translocação diferencial pode ser considerada como um dos mecanismos envolvidos na resistência de *C. bonariensis* ao glyphosate;
- (iii) Através dos resultados obtidos no experimento de expressão gênica, é possível sugerir que existe relação entre a expressão dos genes *EPSPS* em *C. bonariensis* e a resistência à ação do glyphosate em alguns indivíduos dessa espécie;
- (iv) Dentre as misturas de herbicidas testadas no controle de buva, as que apresentaram melhores resultados foram os tratamentos que continham amônio-glufosinato, sendo que a mistura com metribuzin ou diuron, prolongou o controle da planta daninha por mais de 60 dias após a aplicação.

ANEXOS

ANEXO A - Regiões dos genes utilizadas para desenho dos primers.

>gi|48526083|gb|AY545666.1| *Conyza canadensis* 5-enol-pyruvylshikimate-phosphate synthase (**EPSPS1**) gene, **complete cds**

GGCTGGTGTTCATGGCTTAATAACTGTRATGACATTTTGGTGATGCGTAAGACCTGTAAGCACCAGCACAAGTCTAAGT
 CTTGAATCTTATACAAATASGTTTTTTTCTATTTTCCAAATTTATTGAGTTTTCTCRTGAGTTCATGTATGAGCATT
 TTGCATAGTAAAAATATGGTCAGATGGTTTCATCGATGACAAGCTAATTTTTAAGAAAGATATATTACTTTTTCTTTT
 AACTTCGGGAAAATCATAAAAGTGAAATCATCGTTTTAACTTTTTACGAGCATGGTACTCGCGTAATGCAGCGGCGGT
 GGTATAGAAGACGGTCTAATGGTGGCAGTGTCAAGTGGTGTAGGTCTATGTGCACCGAAAACCTCCAAACTGACATAGCC
 GTACCCATTTCCGAAAACCTCATGGAAAACGTTTTCTCTTACGAAAACACGTATGAAAACATTCCTAAAATTTTCTATAGA
 TTAAACGTTTTCTTTGAAGTTTCCATACGGTTTTCTAATTAATATCAAGGTTTTTAAAGGACTTTTTTCGAATCCCCAAACC
 CAAACATGTTATATTATATACAATTTGATCAACATTAATTTTTTATATTACAAAGCCATTATTAACACTAAAACATT
 CAATGAGTGATCACTAATCAAACATGTATTATAAAGTTCTACATATATAATTATACATAATCTCTCAAGTCTCAAATC
 TCCTTTATGAAAAAATTGATATAATTTATATTTGTATATTTTTTTTATTGTTGTACCCGTATCCTGGATTTTTTAGTT
 TTAGTGTCCCGTTCCCGTATTGTTCCCGTACCCTTTTCCCGTACCTGTTTCGGTGCTACATAGGTGTAGGTTGATG
 TAATTGTGATAGTGAAAAGTTTTAGAAGATAAGAGTTTTAAAGTGTTAAGTATTAATAAAGGGTTTTATGGTGAAATT
 AATTCATTAAGGGGAAAATTTATAAACTATTTCTATAGTGGGTTTTTATTAAGAGACAATTTAGTAATTTTATATGT
 GACATATGAGTAACTATTTTTATTTTGTAGAGGGGTGCATAATTTTTATTTCGAAGAGTACGGATAAAAAGTCAATAAATT
 ACGAGCAGTGAAGTATCCAGACACCCCTTGAAGGTAATTTTTTAAAATTTTATTTCATGGAGGTTGGTAGGAAGTG
 GTGGTGGTGGTGGTGGTATGAAATTTTTGTTTTTACCTTCTTCAAACATCCACCTACTACTGACCCCTCCCTTCAAAA
 CCAAACCCAAAATCCAAATCATTAATCCTTCAAACCCACTGTGTGTTTTGTGTGAAATTTTACACACAACAACAAT
 GGCAGTACTCACATTAACACCACCAACATTGCCACAATCTCCAAGCTACCACCAGTCTTTC **CAAAACCCAAACCCC**
ATCAATAAAGTCACAACCTTTTTTATCTTTTGGGCCAAAACACAAAAACCCGATTGCCATTTCTCTGTTTCTTCTAA
 TAATAATAGAAATCTTGGAAAAAATGTTTAA**TAGTTTCTGCGGTTGCCAC**CACCGAGAAACCGTCAACGGTGCCGGA
 AATTGTGTTACAACCCATAAAGAAATCTCGGGTACGGTTAATTTACCCGGGTCCAAGTCGTTGTCTAATCGGATCCT
 CCTCCTTGCTGCGCTGTGAGGTATAGTTTAAATTTGGTAATAATGTGACCTTTAAAATTTGACATTTGGGCTACA
 TGATTGATATGGGTCTTGAATGAATTGTGTTATAAAAATTTGGGAAGTTAAATGTTAATAATAGTTTAAATCCTTTAGAA
 ATTATGAAGTAATGGTTTTAGACCCTGAATTTTTTTTTTATTGCATAGGTTAGTCCCTTAGCTAGTTAGCTTTTTGGTTG
 ACATCTTAGAAAAACCAGTACAGTTTTTATATTTTAGTCCTTAAGCTTCAATTTTTTGAATGTATTGCCATTTGAAA
 TGATCTAGTAAAATGTTCAAATCAATGAATTGGCGGTTTTAAAGATATAATGCTTGGATCAATTGTTATGTAAAGTGT
 GCTAGGCGGTCAAAGCGAATCTTGGATCAAGGAAGTCGTAGAATACTATTGATTTTATATTATTGATTTCTTATTAT
 GCATATTTGACATGTGCTTCTAACATCATGGCATTGGGATTTATTTCTATATATAAAGCATGACTGTATGGTTATAA
 AGTTCAAACCTTGTATGGTATAAATATACTCTTCTTACTTCTTAGCAGGAATGTGTTGACTTATAAGCTGAAAACCTTT
 TATAACTCCAATTTGTGTGTAGTAATACTTGAAGTGGCTGAGTTCCTAGGACAGTATTACATGCGAACACTACAACGT
 GTTACTAAATTTGAGATAGGTATGATTTGGTTTTGTTGGATACAAAGTCTAGGTCAGTTAACATAGCCAGTTGAGGAC
 GATAGCTTTCTTGTCTTATTTCTTTTTATAGAGGGTTTGTGTTTCGTGATGGTAATATTGAGTACCACCATATAGTT
 CACAAGTCATATAATAAAATCAGAGCAACATTCGAGGAGTCGCTATATGCATATTATTGCACCATGCTAAAATCCAA
 GGGCATATTTTGTATGCCAATTTGTAATTTATTTCTCAGGGAACGACCATTGTTGACAACCTTACTCAACAGTGATGATG
 TTCATTACATGCTTGGAGCTTTAAGAACTCTAGGGCTAAACGTTGAGGAGGATGTTGCAATTA AAAAGGGCAATTGTGG
 AAGGTTGTGGCGGTGTGTTTCTGTGGGTAAAGAAGCTAAAGATGACATACAGCTTTTTTCTTGGGAATGCAGGAACTG
 CTATGCGTCCATTGACTGCCGCAGTTACTGCTGCTGGTGGTAATTC AAGGTATTTGGACGTTGTCAATTGACTCATTGC
 TATAGTAAATATATGTTGACTTGTGCACACAAGATTTGAAGCATCTTTTAAACATATATGATTAGATACAGAGAACAC
 TGCATGTTGAAAACCTTGAATACAGGACTTTCTTAAAATATTGGGATTTTACATATATGGGTTGAATAGTTGAAATTT
 CCTCCTTCTACCTTTAACCAATTGTATATTACTTATTTAAAGTTGTGTTTTAAACATGGCGATATGATTAGATACAGA
 GAACACTACTTATTGAAAGGTTTATGTGGTATAGTATGAATTTTAACTCAA AAAAGGGTATCTCACTATCTCTTCATA
 TAGAAGCACACATCTGATTCTGTTATATCTTTATGGATCATTTTTTCCAGCTACATACTAGATGGCGTTTCTCGTATG
 AGAGAGAGACCAATAGGTGATTTGGTCCAGGCTTAAAGCAGCTTGGGGCAGATGTTGACTGTTCTCTCGGGACGAAC
 TGCCCTCCCGTGCCTGTAGTTGGTGGAGGTGGTCTCCCTGGAGGAAAGGATTTGTGTTTTTATTAGTAGTTGTTTTCT
 ATGCAAATAGCAACACACCTTATATATCATCCATTTATAGCTATTTTTTCTAATTGGGGCGTACGTTACTGTAATTTGA
 TCGTCCAACAGTTGTGCATGACCCTCCTTAGCTAAAATGGATGAAAGCTGGTCCGACAATTGACCATAATAAATGGGT
 GTGGGCTATCTTGTCAAATTTAAGTATTTCACTTAAAATGAGAGTTGGTTTACAGTGTGCATTCAACCTAATTTTTTTT
 TTTTAAAGTGCATACAACCTAAAATTTGAATAATGTTGTAGACACAAAAGCTCTTAGTGAGCTTTAATAGTAACATTA
 GAGGTGGTGTATCAATCAAACAATAAGGGAAAAGTAATATGTATAAAAATTAGAATTAACAAGAAGTTTTAAAAAA
 TAGATCAAATGGTTTTGAAAGTCTTCTAAAGTGAATTTAATGCATAAATCTTCTAAATTTATTTTAAAAACTGT
 ATTGTAATATAATTTTTCATCATCATATTTGACATTCTATGAAAACAAATATACATTTTTGAACAAACAGTGTTACGGAT

CGACCCAGGCAATTCAAAGCTGTCCATTCTAACCTAAACCAGTTTTTCACGGTTACCTCTATTTTCCTGCCTTTCAATT
 TGCCAGCTACAAGAAGCTTCATTCCACCATAACGGGTTACGCTAAAAGATGCAAAGAGTCATGATTCGTTATTTATTA
 TCTTGACTTATTATGATAACAATAGTTTTGGTGTATTTTGATGTCTTCAGGTTAAGTTGTCGGGATCTATTAGTAGTC
 AATACCTTACTGCTCTGCTTATGGCTTCTCCCTTGCCCTTGGGGACGTGGAAATTGAAATCATAGATAAACTAATTT
 CCATACCATATGTGAGATGACACTGAAATTAATGGAACGGTTCGGCGTCTCGGTAGAACATAGTGATAGTTGGGACC
 AGTTCCTTATTCGAGGCGGCCAAAAGTACAAGTAAGTCTATTTCTTTCTTTTAAAGTAAAAC TGAATTTAAAAAG
 TTGCAGTTTCTACCCTATCTCTTGTAATGGGTTGATTCAGGTTATGTATAATCTCTAATGGGTCAAAGGGGGTAAAAA
 ACAAAAAGGTTATTTTGTCAACAAAACGATATGATGCATATTACCTAGTTTTCTTATTGGAAATAGTAAACATTTTTTAA
 TCATTTCAATGTACAACCTTTTTATGTGTCCACAGAAATTAACATAGCCCCCTAGGACTATGTTTCATCATTTCCCTTT
 ATAACTAGTTGGAGAAAAGTATTTTGGCCAACCCATTCGGAATTTACACATTTTGGCCTATCACCCAGCCCGTCTGT
 CCACTCATTTTCAGGGTTTTGTATGGAGACCCGTTTGTAAATTAGTTGGATTAATTATCTTCAGGTCACCTGGAAATG
 CTTATGTAGAAGGTGATGCGTCAAGTGCAGTTACTTCTTGGCTGGTGTGCCATAACCGGAGGCACCATCACCGTTG
 AAGGCTGCGGAACAAGTAGTCTGCAGGTGCACCTTGACCTCCTTTGTTTTTATTCTTCTCGATTTCAATCAAACGGC
 TTTACGTTTTTACATTTTAAATGGATTTTGTGGAACAACGAGTATTAAGTTCAATAAAAAGTTTATTATTATTATT
 TTATGCAACAATTATCAGCATCTGTAGTGAAATATTCAGAAGTCCGTTTTTTAGTTCAAAGTTTTTCTTTTTAACCTTA
 AAGTCAAAGTGAGATGGCAAATCTTTTACGTAAAATGATTC AATTGAGGCTGTA CTTTTGGTTCGATTCTGACTTAATT
 GGGAACATAGGTTACGTTAGCTATAAGCCTATAACTATAAGTAAGCATGTGTTTATATGTCACAATGACTTGATTAAA
 AGTAACTTATGATTTTTCTTAGTATACGTTAGTAATCTAACAGTATCATAATAACGGACAAAAATGTGCTGGTGGATC
 AGCCACCCAGCCGTTAGAACATGACATAAAAAATGACCCAACCTTGACCTATCACCTAAGCTCATTATAATATGTTAT
 CCAACCCACCTATCTTGGCCACCTGTGACCTGTATTCAAATGTATACTGTAAAGCAACTTCCTGTTTTTCTTAAAAAC
 ATGTATTCTGTTTTTCTTTCCAATGAAAGGGTGTATGTGAAGTTTTCGGGAGGTACTTGGACAAATGGGTGCGGAAGTA
 ACATGGACTGAGAAGTCAAGTACAGTTAAGGGCCACCAAGGGATTCTTCTGGAAGGAAACATTTACGTGCTGTTGAT
 GTGAACATGAACAAGATGCTTGATGTTGCCATGACTCTTGCTGTGGTTCGCTTTTATGCTGATGGCCCTACAGCCATT
 AGAGATGGTATCCTTCTTTTAAATGTGGAAGGTTCAACATGTTTTCACTAAGTTTTTCAAAGTAAATAGATAGATA
 TGACTTCAAATAACTCTATTGCCATGTTAAATCTTACACATATTGCAAGCACATTCTAGTGGTGGTTTTGGAATGGCA
 TTATGAAATGAAATATCTAAAAATATTTAATTTAAACATGTTTCGGTTTTCTGATCATTTAGGGTCAAGTTTTAACTGAATC
 TCAGAGAAGTTCGCGCAAGACATGTCACATATTTGTTTTCTCCGAGTCTCAGACAAC TGTCTTTTTCAAATGAAAGCATT
 CTAGAACTATTTTTGCTTACAGTTGATTTTTCTAATTTCTGGGTGTACATAAATCAAGATAATTACTTTTTATAAAACACAT
 TCAAAAAGCCTCCTAGATGCCCTATTATGAATTTTTCTGTTTGTATACGAGTATCTGCTTTGTTTTGAAAAATGGTT
 TTTTTGTTTTTTGCCAGTTGCTAGCTGGAGAGTTAAAGAAACCGAAAGGATGATTGCCATTTGCACAGAAGTTAGAAA
 GGATAAAATGATACTTTGTTACTCTGTGATCTATGATACTGCTATTGCTTAGAGGTCACTAAAGTGGTAAGGTCAAATA
 TAAATGAAATGATTTAGAATTAGAATGTTTTGGGTGCTTGCAACCTATTCATTTTAAAGCTATTTTAAATGTTCTTTTTG
 ACCCATTAGAAAATATACATAAGAAAATATACTTAAATCAGTCCCTCTATTGTTAATGTTTATCTGGGGTGAAATTTCTTCA
 GTTGGGAGCAACAGTTGAAGAAGGTCCGGACTATTGTGTGATCACTCCGCCAGAGAAGTTAAACGTGACAGCAATAGA
 CACATATGATGATCACAGGATGGCCATGGCTTTCTCTCTTGCCGCTTGTGCAGATGTT**TCCTGTGACCATTAAGGATCC**
 TTCTTGCACACGTAAGACGTTTCTGATTACTTTGAAAGTTCTTCAAAGATTTGCCAAGCATTAATGTGATTATGGGTA
 GTGGTTTTGCTTTCTATATGTAATTTTTGTTTCATTTGTAACGAGTAAAATGTGAGTTTTGGGCATAACATATTTCTTA
 TGAACCTGTATTCTTTCGTAAGATTTTTTTTAGTGTAAATAAAATATA

PRIMERS :

EPSP1_2_F: 5'- CAAAACCCAAACCCCATC -3' (Tm = 51.6)

EPSP1_R: 5'- GTGGCAACGGCAGAAACTA -3' (Tm = 55.7)

>gi|48526085|gb|AY545667.1| Conyza canadensis 5-enol-pyruvylshikimate-phosphate synthase (EPSPS2) gene, complete cds

GTGTTTTCTCAACCAAAATCCCCCCCCGCCCCCCACAAAACACACAATGGCAGTTCACATCAACAACCTCCAACATACC
 CATTTC AACACTTCCAATCT CACAACCCAAAACCCCATC TTCAAAGTCATCATCTTTTTTATCTTTTGGATCCAACCTT
 CAAAAACCCATTAAAAACAATAAACAATAATTATAACCTCTGTTTCTTGTAATGTGAAAAACAACAAAAACCCATT
 TAAAGTATCA GCTTTCTCTGGCCACTTCCAC CAAAGAGAAGCCATCTAAAGCTCCAGAAGAAATTGTGTTGAAACCCAT
 TCAAGAAATTTTCGGGTACGGTCCATTTACCCGGATCCAAGTCTTTGTCTAATCGGATCCTCCTTCTTGCTGCCCTGTC
 TGAGGTATCTTTTATAAATTATGTTTTGAATATTTGAATTTAATTAGTGTGTTGATTGATTGACTAGAAATTTGATTAT
 TATTAAGATATAGGAAAAGATATGTACATTAGTTTTTACTGAAATGTGAAAAATGTCTTAATGTAGTAACTCACAAAG
 TTTTGTGTTGTGATCTATAAGTTTACTTTATAAGGTTACTCTATGGGAAAAGGTTACGTAGATTTTGGTTTTCTTTGAC
 CTCTGTAGTTGGTATGGCCATGAGAAGAAGTAGGCCTAAAAAGAGCTTTGCTTGTGAGAGGACATGACCATACTTAGA
 GGACTAGGATTAGTTTAGAGGAATATGGTAGATCAGTAATCCTTTTAGGTATTTAGGGGTAGTCTATATACTTATAT
 GTAGGAAGGTCAGGCATGATACCTTTCTTATATGCTCGTATACTCGTAATTGTTGCTCTCAGTCCATTTGCTTGGTTT
 TATGCAAACGGTTATGTTTATTATGTTTTTATACTGATGTCTAATATGTTCAAATGTCCTATCTACTATGTATTGTCC
 ATTTTGCCTAAAGTGTCTACGTGGTATGTTTACTTCCCTTTACTCTTAACGTAGGCAGCTCATAACCCGACCGA
 CAAGTATGGTTTGTCTAACTCTTTACACTCTCCTACTTTTGCATCATATGGCCGGAGGTCCTTATGGAAGCAGTCTCT
 CTACCTTTGGGTAGAGGCAAGATTGTCTACATCTCACCTCCCCCATAACCTGCTCACTGTGTTGTTTAGTTTATTTAA
 AGGTGGAAGGAAAGGAGATGAGAGGAGAAATATATAAGATGCATTCTTAAGATTTTTTTAAGTGTGGAAGGGAAGG
 AGTAGAAAGGATTAGAGGGGGAAGTTGATATGGATCTGCGGGAAGTTTATATTATTTAGTAATATAATATTAATTTTA
 TTATTATTATGATTAGGAAAGTATTGTCTTTACTTAGATATCTTATGATRTCTTTTATATTATTTAGTTAGCTTGATC
 ATCAAGCTATAGGATTAGTATAAAAAGAATATTAGGGTTGTAATTCTAAAGTATGAAATATTAATCAGAAGTTTATTG
 TTCTTGTTTAATCAATTTAGGAGTTTACTGGTTCTCGAATACCAGCCTATCTTTGTTATTGTTCTTATCATTTGATAC
 AAGCCATTGGTTTCGTATCAATTTGGTATCAGAGCATCGATCTTGAACCTGTGCTTTTCTCAACTATGGAATCAAGGA
 CGATCATTTGATTTGATGCTGATGTACAGCAATACCGTGAATCTACTAGGCTTGGGTGGCATAATGCTGCTCGGA
 TCAATCGTTTTCAAGCAGCCACCGCGCATCTCAGTTGGCCACTCAACAATTTCACTTGAGGTTTACAAGTGGTGGG
 ATAAACTTGAACCAGTTGTAGTTGGGACACAGCAGAAGTTGGATGCATTGGCGGCAGTGGCAAACAGCCTCTACCCC
 AGCAACCGATGATTAGGAAAGTTGTCATACCAACAGTCCCTACAACCTTCAACAAAAACAAATCAGTTTGGGTTGAAGC
 AATCGAAGGTTTCAAGCAGGGTATCCTTATCCAGACACCTTCAGATCTTGAAGGAATAATCATCCTGATGTGAA
 CCAAGAACGAGGAGCTGGACTAACATTCAAGGACATAAGCAATGCTTATGAAGATCTGGCAGGCGATGAAAAGCGATC
 CATATATGACATGAATGGGAGAAATGGGCTTAAAGGTACATGTTTTGGTTTAAAGGAATTGTGCAAAAGCTGATGAACT
 TTCTGGTTTGATACATATGATTGAGTTTGTAAACAACCTTCGATATGATCAGCAAGCTATGGAGTTTCAAGTCAGAAT
 TTGGGATCCTGGAATTACTCGAAGGAACAATTTAAAGCAACACCTTGGAGACAAGGTGTTTTTGGGGTGGGAGTAATG
 ATATGGATCTGCTGGAAGTTTATATTATTTAGTATTATAATATTAATTTTATTATTAATATGATTAGGAAAGTATTGT
 CTTTACTTAGATATCTTATGATGTCTTTTATATTATTTAGTTAGCTTGATCATCTAGCTATAGGATTAGTATAAAAAG
 AATATTAGGGTTGTAATCTAAAGTATGAAATATTAATCAGAAGTTTATTGTTCTTGTTTAATCAATTTAGGAGTTTA
 CTGGTTCTCGAATACCAGCCTATCTTTGTTATTGTTTGGATACAAGCCATTGGTTTCGTATCAGAAGTTTGTGTTTTT
 TGTCTCAAAAGTTTTCCCCTCATTTTTGAGGTGATTAGGAAGGAAAACCTCTCTTCCCTCTCATCTCCTTTCCCTCCCT
 TAAGTTAACTAGACATTAATGAATATTGGGTCAATTTGTTGTTGTGGCTATAAGGAATGACTTGACTTAAAACTTAT
 AGAAATGCTGTGTTATCCAGTAAGTAATCGTTTTTTTACTATTTGTCTTTTAAAGACCATTCAATTAAGCACATAAAACA
 AACAAACATCCTGCTTAATCGATGTAGACTACATACATGTAGACGGACATTTTATCCATAAACAGCTAATTAGTCATA
 CATAGCCATTTATATGTTTTACATCGTGCAGTGTAAAACCTCTGCCTTTACTGCTAAGATTTTTTTGTTTACATATATA
 TTAGATATATTAAGTTTGTATTTTGTATGCTAACATTTAACATTACTTTTTTTTTTTTTTAACTCGGGGAGTGGGTTAAAGTG
 GTTCTTCTACTTGGTTTTAGTTTTTGTATGTATATCCAATATTTATTGTGGGTAATTTAAAGTTTTGAAATTTTTGT
 TTTTTTTTTGTGAACAGTATAAAGTTTTCTGACTTTTTTGTATTTTTTGTGAGGTAAAGTCGTGAATGTGTAATTTGGTAT
 TTGATTGATATTCTTGATATTGGTACATAGTGAGGTGCAAGGTGCTGATGGTTTTCTTAGACGGGTCATGTTTGTTTTG
 TGAAAATACATCTGTTTTTTTTCTTTGATAACAAGTTATAGAAGTTGCACCCAAAAATGTTCTTGTTTAAAGCGATAAA
 AATTTGGATAGAAGGTGACGGTTAATGATTGATATATTGATTTGAGTTTCCCTTTTATCTATTGCATTTTCAAGTT
 CAACATTCCACCCTCGATTTTTTGTGATGAATCTATGACTGAAGAAAAGGGCGATTGTTGCCTTTGGCAATCAGTTTTGG
 ATTTTATTTTGTGCATGGAAGGGGGTGTAGTTTCTGAACCTTAGTAGAAGATGATAAGCTATAGTTTCAATATTGCT
 TTTCTTTCTTGCATCTGAACTGGTTTTTGCATTTTTTCAAAGGACTATAAAGATGCTATTTATCACCTATGACCTATGT

TATAAATAGTAAGGTATTAACCTATTAATATTTGGTATAGTCTTGAGAAAATCCATGAATTTTCGATTGAGTTCATAGGAC
 ACATCTAACTTATGTTTTCTTTACATTACGATTTACACATCTTGTCTTTGACGTCTGATTTTTAAAAATAGCGTTTTCTATT
 GACATTATGCATTTCTTTGAGTTCCTATATAAAATTTTTGTAAGCTTTCCATATGTATATACTATGAATCTGAGTGAA
 CTTATGCTATCAGGGGACTACTGTTGTAGACAACCTGTTAAACAGTGATGATGTTTACATACATGCTTGGAGCTTTAAG
 AGCTCTAGGGTTAAAATGTTGAAGAAAAATAGTGAATTTAAAAGAGCAATCGTAGAAGGTTGTGGTGGTGTATTTCCCGT
 GGGTAAAAGAAAGCAAGGATGAAATCCAGCTTTTTCTTGAAATGCAGGAACAGCTATGCGTCCATGACTGCTGCCGT
 TACTGCTGCCGGTGGAACTCAAGGTATTTTTAACTTAGTGTATATTTCTCTCGCATTTTTATGTCTGCTTCATCCTCCT
 ACACATACATTTTCATGACATGTGTACCCATTTCTCTCACCTCATCATTTTCATTTTTCTATGTGTCCACAATTTATATGAG
 TAGGAGGATTCATACTTTTCATAGGCATAAAATTTGAGGAATCAAATATCGTTTTCTTTTTAACTAACATCTCTTGATTA
 GCTATTATAATCCGTAGAACGTATATTTAAAGTTTTTTGTGCCGATATGTAATTTTTAAGGTGAATACACAAAATAAAAAAT
 TTTACCTTTCTGTTTGTTCATGTTCTGTACATATAAAATTTTTAGTTTTTTGTTATATATCTAAGAATCTAAGATCTCT
 AAAATATCTTCTATTAGTTGACACAAAATTAAGGGATCACATGAACTGAAAATCAATAGCATCCACTTGTGATAATG
 CTGCAATTTAATGCCAAAGAAGAAATTTATGCAATTTCTTATTATCATTTTTATTATGGGAGACAGTGAGTATGAAT
 TGGGAATCGATAATAGAGTTGACCAACTTGGTGGTGTGCGGTAGCTAAGGTAGTTACATTTGATATGATATGATAAT
 ACCCTAACAGTTATGAGTTTTTTCTTCAGCTACATACTAGATGGTGTTCCTCGAATGAGGGAGAGGCCAATTTGGTAT
 CTGGTCAACCGTCTAAAACAGCTTGGTGCAAATGTTGATTGTTCTCTCGGTACAAAATGCCACCCTCGTGTAGTT
 GGAAGTGAGGGCTTCTGGTGGAAAGGTAATCAACAATAAGATTGCTGCATTTTTAAAGTCGTAAGAATTAATTTATTT
 GGTTCCATATATGATTGGAAAATTTGGTTATTTAAGAAAATTAATTTAGTAATGAAATTTATAGTTTTTTGAATCTTTT
 TGTAATCTTCTTTCCCTGGCTTCTTATTGCAGGTGAAATTTGTCAGGATCTATAAGTAGCCAATACTTGACTTCTTTG
 CTTATGGCGCTCCTCTTGCCTGGGAGACGTAGAGATAGAAAATTTGATAGATAAAATTTGATCTCTGTACCATATGTGGAG
 ATGACACTTAAGTTGATGGAGCGTTTTGGGTTTTCAGTAGAACACAGTGATACTTGGGACAGATTCATGTCCGAGGC
 GGTCAAAAGTACAAGTAAGTTGATCATTTTCAAAAAGTCAATYTTTACGTGAAGATCGGTCAACATCTATTTTAATCC
 GATAAAATCTCTTTAGGTCACCTGGAAATGCTTATGTGGAAGGTGATGCTTCAAGTGGAGTTACTTCTTAGCTGGT
 CTGCCATCACTGGCGGAAGTGCACCGTGAAG **TTTCCCGGACAGCC** GTTTACAGGTATTTATCCATGTGCCACCTC
 AAAGATATTTCAAAAATTAATTTGTTTCTCAAGTATATATTTCTTCTAGTTAATTTGCAAATTTTTTTTGGCCCATACGTCT
 ACCCATTTCTATAAAATTTTCGTCCAAAAGTTGGTGACTCGGTTCAATCGTGTAATAAGTCTCTTTTTTTGTTTTTTTGAATTT
 GACAATTTATGTCAGTTCTTGGTTATATCAACGATGTGGGGAGTGATTTGTGCACACATTTCAAAAAGAAAGGACATTTA
 GTCTTTTTGCTTTCTTTTTGCTCAAGATCATCTTTCATCTTTTTCAAGATACTCTGCACCTCATTTGCATTTATCAAAGTT
 TTGGATGCATTTCTGTAACCTGTGGTACAAGGAGGGAGACATAATATGTCATTAGTTCTTATTCTTAAAGCTCAATGCACA
 CTATCACCTCTTACTTCTTTTTTCTTTTTTTTTTTTATTAGTTTTATTTAAGCTCAATGCACACTAACACTTCTTCTT
 TATAACTTCAAGTCATTTCAATTTTAAATTTTTGAAGCTGATGGTTTTTTGACATTAAGATAGAATGATATATACATAT
 TGCATTTTCACTTACCTATTTGATGTCCTTGTGATCTTTAATCAGGGTGATGTAATAATTTGCTGAGGTCCTTGGACA
 AATGGGCGCTGAAGTAACCTGGACAGAGAAGCTCTGTACGGTGAAGGGTCCGCCAAGGAATTTCTTCCGGAAGGGGACA
 CTTGCGTCCAGTAGATGTGAACATGAACAAAATGCCGGATGTTGCGATGACTC **TTTCTGTTGTTTATGCTGA**
 TGGCCCCACTGCCATTAGAGACGGTATGTGTTAGAATTCACCACAGCTTTGTAATGTTAAAATATATGTTAGTTTAGAT
 TAACAAAATGACTATATGATCACAAAAGGAAACATTTATCTCAAAATTTGGAACATAATATAGTATCATACTATATAGC
 AATTGTAGTTTTCAAAGAAATCCTTAAAGGTCGTGTTGTTTTATTATACATGACTGGGTATATATTTGTTTTTTGTGCTCAA
 GCTTTTTAAAAATCACATTTGACTATCCTTTATTGAAAGGTTAATTTTTGTTTATGCTCTCATTTTAGGCAATTTACTTTT
 TATCAAGGAAAAAATAGCAATCAATGTCTATGGTCGTAGTTTAGGCAATTTAAAACCCATCAATCAAAGTGTCTTGGT
 TCAAGGCATATTTAGAGATAAATGGAGATAATAGTACGTGGATGTCTTTTCAAAGAAAGTACAAAATTTTTCTTGGGC
 TCTTTAGTTTTTACTGAAAATACCAAATCCTTTAACTGAATTTGTCTAAAATAGAAGAACTGGAATTTAGTTGCTAT
 TTTGTGAAAACGAAAAGTAAATCGCCAAAATTTGAGGTTAAGTATGCTTATATTTTATGTAATTCATCTTTTTGAAA
 AATGTAAGAAGTTAAATGGAAGTGAATTTGATTTGAAAAATATATATTTAAAGCACCCTTATGAAGAAATCTAGAAATTT
 GAGTTTTTAGGATCTGTAAGACATCCTGTATATTTGATGAGAAATAGATATATCGTACACCACAATCCATCATTTTTTAC
 TTTTCACACGACAAAAGTGAATATGAAAAAATGTGAGTTAAAAACACTTAAAAGGCAGTTTTTGGGTGTGCAAAAGTAAAAAT
 GTAGCACAATTTGGCCCTTTCTCATATTTGGGTTTACATATTTCTTCTTTTACGTATATCCCTATATTTGTTTATTTTGTG
 GGCCCATCTCACGTCCGTAATCATTAGATGGACTAAAATCATATTTCTTCTTATATTTGGGCAGTGGCTAGCTG
 GAGATAAAAGAAACGAAAGGATGATTTGCCATCTGCACAGAATAAGAAAGGTACAAGTCATTAACCCATCTTACTC
 TAAAAAATAGAAATGGCCATGAGTACTTTTAAAGTACTCAATGAATTTGCCCATTATTTGTTTGTGCTAATAGGCCCT
 TTTGGCTTGAACATTTTTCAGTTGGGAGCAACAGTCAAGAAAGTCCAGATTTTGTGTGATCACTCCACAGAGAAA
 TTGAATGTGACAGCAATCGACACATACGATGATCACAGAATGGCCATGGCTTTCTCGCTTGGCCTTGTGACAGAGGTT
 CCTGTCACCATTAAGGACCCGGGTTGCACCCGTAAGACCTTCCCCGACTACTTTGAAAGTTCTTGAAGATACACTAAG
 CATTAATCACATATAAGATGTTTCAAGAAAGAAAGGGTTAGAGGTTTTAAAAATGACACCTTTACCCTTCACTCCTTCA
 CCATTATCTTTCTTCAGAAATGTTTCACTTACAGAGTTACATCATATGTATATGGGCGACCTGAGCGTATTTTTATC

PRIMERS :

EPSP1_2_F: 5'- **C**AA**A**ACCC**A**AA**C**CC**C**ATC -3' (Tm = 51.6)

EPSP2_R: 5'- **G**T**G**GA**A**GT**G**GC**A**G**A**AA**A**GC -3' (Tm = 56.3)

EPSP2art-F: 5'- **G**TT**G**CG**G**G**A**CA**A**GC**A** -3' (Tm = 53.0)

EPSP2art-R: 5'- **A**GG**G**CA**A**CC**A**CA**G**CA**A** -3' (Tm = 54.8)

>gi|48526087|gb|AY545668.1| Conyza canadensis 5-enol-pyruvylshikimate-phosphate synthase (**EPSP3**) mRNA, **partial cds**
 GCCAATACCACCAAGAGAAGCCATCTAAAGCTCCAGAAGAAATTGTGTTGAAACCCATTCAAGAAATTTCCGGGTACG
 GTCCATTTACCCGGATCCAAGTCTTTATCTAATCGGATCCTCCTTGCTGCCCTGTCTGAGGGGACTACTGTTGTA
 GACAACATTATTAACAGTGTATGATGTTTACATGCTTGAGCATTAAAGAGCTCTAGGGTTAAATATTGAAGAAAAT
 GCTGCTATTTAAAAGAGCAATCGTAGAAGGTTGTGGTGGCCTATTTCCCGTGGGTAAAGAAGCCAAGGATGAAATCCAG
 CTTTTTCTTGAAATGCAGGAACAGCTATGCGTACATTGACTGCTGCCGTTACTGCTGCTGGTGGAAATTTAAGCTAC
 GTACTAGATGGTGTTCCTCGAATGAGAGAGAGGCCAATTGGTGTATCTGGTCAACCGTCTAAAAACAATTGGTGTAAAT
 GTTGATTGTTCTCTAGGTACAACTGCCACCAGTTCATGTAGTTGGAAGTGGAGGCCT**TCCTGGTGGAAAGGTGAAA**
TTGT**C**AGGATCTATAAGTAGTGTATACTTGACTTCTTTGCTCATGGCAGCTCCCCTTGCACTGGGAGACGTAGAGATA
 GAAATTATAGATAAATTGATCTCTGTGCCATATGT**ACGGATGACACTGAAGTTGATG**CAACGGTTTGGGGTTTCAGTA
 GAACACAGTGATACTTTGGACAGATTCCATGTCCGAGGCGGTCAAAAGTACAAGTCGCCTGGAAATGCTTATGTGGAA
 AGTGATGCTTCAAGTGCAGGTTACTTCTTAGCTGGTGTGCCATCACTGGCGGAAGTGTACACCGTGGAAAG**GTTGCGGG**
ACAAGCAGTTTACAGGGTGTATGTAATAATTTGCTGAGGTCCTTGACAAATGGGTGCTGAAGTAACCTGGACAGAGAAC
 TCTGTACAGTGAAGGGTCCGCCAAGGAATTTCTTCTGGAAGGGGACACTTGCGTCCAGTAGATGTGAACATGAACAAA
 ATGCCAGATGTTGCGATGACTC**TTGCTGTGTTTCCCT**TTATGCTGATGGTCCCCTGCCATTAGAGATGTGGCTAGC
 TGGAGAGTAAAAGAAACCGAAAGGATGATTGCCATCTGCACAGAACTAAGAAAGTTGGGAGCAACAGTCGAAGAAGGT
 CCAGATTATTGTGTGACCACTCCACCAGAGAAATTGAATGTGACAGCAATTGACACATACGATGATCACAGAATGGCC
 ATGACTTTCTCGCTTGCTGCCTGTGCAGACGTTTCTGTACCATCAAGGACCCAGGTTGCACCCGTAAGAGCTTCCCC
 GACTACTTTGAAGTTCTTGAAAGATACACTAAGCATTAAAACAATTTTTTATGTTCAAAAAGAGAGGGTTTTAGCGGG
 TTTAAAATGACGCCTTTACCCTCCACCGTTATCTTTCTTTCAGAAGGGA

PRIMERS :

EPSP3_F: 5'- **T**C**T**G**G**T**G**G**A**A**A**G**G**T**G**A**A**A**T** -3' (Tm = 54.0)

EPSP3_R: 5'- **C**AT**C**A**A**CT**T**C**A**G**T**G**T**C**A**T**C**CG**T** -3' (Tm = 55.0)

EPSP2art-F: 5'- **G**TT**G**CG**G**G**A**CA**A**GC**A** -3' (Tm = 50.6)

EPSP2art-R: 5'- **A**GG**G**CA**A**CC**A**CA**G**CA**A** -3' (Tm = 51.8)

>gi|62319701|dbj|AK221176.1| Arabidopsis thaliana mRNA for translation
elongation factor eEF-1 alpha chain, partial cds, clone: RAFL22-97-N17
 TATCTTAAGAGAGGATACGTTGCCTCTAACTCCAAGGATGATCCAGCTAAGGGTGCCGCCAAGTTCACCTCCCAGGTC
 ATCATCATGAACCACCCTGGTACAGATTGGTAACGGTTACGCCCCAGTTCGATTGCCACACCTCTCACATTGCAGTC
 AAGTTCTCTGAGATCTTGACCAAGATTGACAGGCGTTCTGGTAAGGAGATTGAGAAGGAGCCCAAGTTTTTGAAGA**AT**
GGTGACGCTGGTATGGTTAAGATGACCCCAACCAAGCCCATGGTTGTTGAGACTTTCTCCGAGTACCCACCTTTGGGA
 CGTTTCGCTGTTAGGGACATGAGGCAGACCGTTGCTGTTGGTGTATTAT**AGAGCGTGGACAAGAAGCA**CCCAACTGGA
 GCCAAGGTCACCAAGGCTGCAGTGAAGAAGGGTGCCAAATGATGAGACTTTCGTTATGATCGACTCTCTTATGGTTTT
 CTTTGGTTCTTAAAACCTTTGATGGCGTTTGAGCCTTTTTCTTTTTCTCTTTATTTCTGTGACTTTCTCTCCCTCC
 TTTTTGGATATCTCTGAGACTTTTTTATTATGGTTTTTCAATTATGCAGTTTTCCGGATAATTTTTGCTTGAAAAA

EFl1alfa_F: 5'- **A**T**G**G**T**G**A**C**G**C**T**G**G**T**A**T**G**G**T** -3' (Tm = 56.6)

EFl1alfa_R: 5'- **T**C**T**T**C**T**T**G**T**C**C**A**C**G**C**T**C**T -3' (Tm = 55.9)

2. Resultado do BLAST com seqüência de um dos fragmentos de *C. bonariensis* gerados por reação com *primer* EPSPS2art_F e EPSPS2art_R.

```

>  gb|AY545667.1| Conyza canadensis 5-enol-pyruvylshikimate-phosphate synthase
(EPSPS2) gene, complete cds
Length=7954

```

```

Score = 320 bits (173), Expect = 2e-90
Identities = 180/183 (98%), Gaps = 1/183 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

```

Query 71 CAGGGNTGATGTAAAATTTGCTGAGGTCCTTGGACAAATGGGTGCTGAAGTAACCTGGAC 130
      ||||| |||||||
Sbjct 6206 CAGGG-TGATGTAAAATTTGCTGAGGTCCTTGGACAAATGGGCGCTGAAGTAACCTGGAC 6264

Query 131 AGAGAACTCTGTCACAGTGAAGGGTCCGCCAAGGAATTCTCCGGAAGGGGACACTTGCG 190
      |||||||
Sbjct 6265 AGAGAACTCTGTCACAGTGAAGGGTCCGCCAAGGAATTCTCCGGAAGGGGACACTTGCG 6324

Query 191 TCCAGTAGATGTGAACATGAACAAAATGCCGGATGTTGCGATGACTCTTGCTGTGGTTGC 250
      |||||||
Sbjct 6325 TCCAGTAGATGTGAACATGAACAAAATGCCGGATGTTGCGATGACTCTTGCTGTGGTTGC 6384

Query 251 CCT 253
      |||
Sbjct 6385 CCT 6387

```

```

 gb|AY545668.1| Conyza canadensis 5-enol-pyruvylshikimate-phosphate synthase
(EPSPS3) mRNA, partial cds
Length=1452

```

```

Score = 357 bits (193), Expect = 3e-102
Identities = 200/203 (98%), Gaps = 1/203 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

```

Query 51 GTTGC GGGACAAGCAGTTTACAGGGNTGATGTAAAATTTGCTGAGGTCCTTGGACAAATG 110
      |||||||
Sbjct 851 GTTGC GGGACAAGCAGTTTACAGGG-TGATGTAAAATTTGCTGAGGTCCTTGGACAAATG 909

Query 111 GGTGCTGAAGTAACCTGGACAGAGAACTCTGTCACAGTGAAGGGTCCGCCAAGGAATTCT 170
      |||||||
Sbjct 910 GGTGCTGAAGTAACCTGGACAGAGAACTCTGTCACAGTGAAGGGTCCGCCAAGGAATTCT 969

Query 171 TCCGGAAGGGGACACTTGCCTCCAGTAGATGTGAACATGAACAAAATGCCGGATGTTGCG 230
      || ||
Sbjct 970 TCTGGAAGGGGACACTTGCCTCCAGTAGATGTGAACATGAACAAAATGCCAGATGTTGCG 1029

Query 231 ATGACTCTTGCTGTGGTTGCCCT 253
      |||||||
Sbjct 1030 ATGACTCTTGCTGTGGTTGCCCT 1052

```


ANEXO C - Resultados da amplificação dos genes.

EPSPS2: (início 5180 - término 6385)**EPSPS3: (início 539 - término 1052)**atgc: nucleotídeos que diferem
entre as seqüências

ATGC: primer EPSPS3_F

ATGC: primer EPSPS3_R

ATGC: primer EPSPS2art_F

ATGC: primer EPSPS2art_R

AGGTGAAATGTCAGGATCTATAAGTAGccaATACTTGACTTCTTTGCTtATGGCgGCTCctCTTGCACT
 AGGTGAAATGTCAGGATCTATAAGTAGTGTATACTTGACTTCTTTGCTCATGGCAGCTCCCCCTTGCACT

GGGAGACGTAGAGATAGAAATgTAGATAAATTGATCTCTGTaCCATATGTggaGATGACACTtAAGTTG
 GGGAGACGTAGAGATAGAAATATAGATAAATTGATCTCTGTGCCATATGTACGGATGACACTGAAGTTG

ATGgAgCGGTTTGGGGTTTCAGTAGAACACAGTGATACTTgGGACAGATTCCATGTCCGAGGCGGTCAAA
 ATGCAACGGTTTGGGGTTTCAGTAGAACACAGTGATACTTTGGACAGATTCCATGTCCGAGGCGGTCAAA

AGTACAAGTAAGTTGATCATTTCATAAAAGTCAATYTTTACGTGAAGATCGGTCAACATCTATTTTAATC
 AGTACAAGT-----

CGATAAAATCTCTTTAGGTCaCCTGGAAATGCTTATGTGGAAGgGTGATGCTTCAAGTGCAGTACTTCT
 -----CGCTGGAAATGCTTATGTGGAAGTGTGATGCTTCAAGTGCAGTACTTCT

TAGCTGGTGTGCCATCACTGGCGGAAGTGTACCGTGAAGGTTGCGGGACAAGCAgTTTTACAGGTATT
 TAGCTGGTGTGCCATCACTGGCGGAAGTGTACCGTGAAGGTTGCGGGACAAGCAgTTTA-----

ATCCATGTGCCACCTCAAAGATATTCAAAACTAAATTGTTTCTCAAGTATATATCTTCTAGTTAATT

GCAAATTTTTTGGCCCATACGTCTACCCATTCTATAAATTTGTCCAAAGTTGGTACTCGGTTCAATC

GTGTAATAAGTCTCTTTTTGTTTTTTAGAAATGACAATTTATGTCAGTCTTGGTTATATCAACGATGT

GGGAGTGTATTGTGCACACATTCTAAAAGAAGGACATTTAGTCTTTTGGCTTTCTTTTGCCTCAAGAT

CATCTTCATCTTTTCAAGATACTCTGCACTCATTGCAATATCAAAGTTTGGATGCATTCTGTAAGTGT

GGTACAAGGAGGGAGACATAATATGTCATTAGTCTTATTCTTAAAGTCAATGCACACTATCACCTCTTA

CTTCTTTTTCTTTCTTTTTTTTTATTAGTTTATTTAAGTCAATGCACACTAACACTTCTTCTTTATAA

CTTCAAGTCATTCATTTAATTTTTGAAGCTGATGGTTTTTGACATTAAAGATAGAAGTATGTATATACA

TATGTCATTTTACCTATTGTCATGTCTTGTGATCTTTAATCAGGGTGTGTAATAATTTGCTGAG
 -----CAGGGTGTGTAATAATTTGCTGAG

GTCCTTGACAAATGGGcGCTGAAGTAACCTGGACAGAGAAGTCTGTCACgGTGAAGGGTCCGCCAAGGA
 GTCCTTGACAAATGGGTGCTGAAGTAACCTGGACAGAGAAGTCTGTCACAGTGAAGGGTCCGCCAAGGA

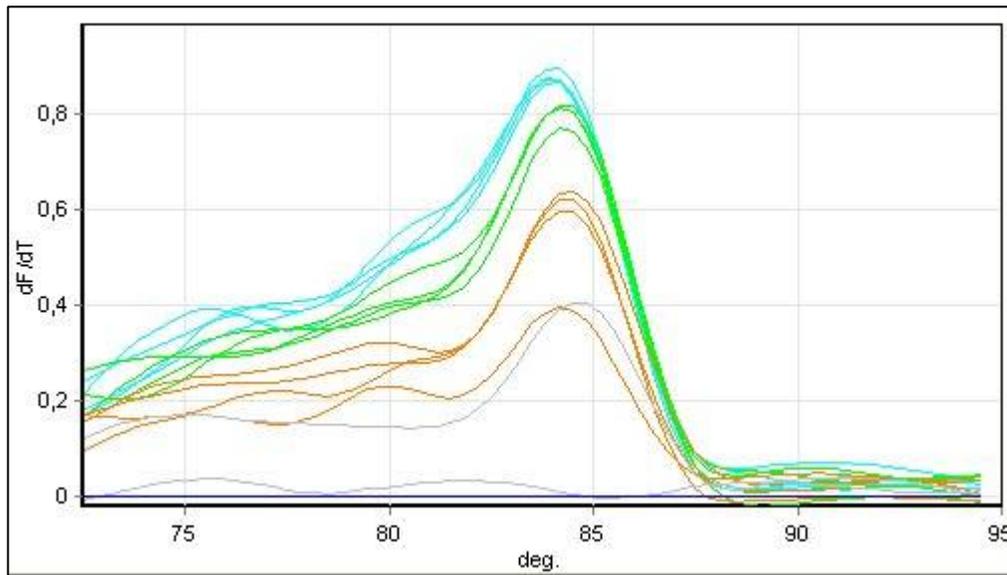
ATTCTTcGGAAGGGGACACTTGCGTCCAGTAGATGTGAACATGAACAAAATGCCgGATGTTGCGATGAC
 ATTCTTcGGAAGGGGACACTTGCGTCCAGTAGATGTGAACATGAACAAAATGCCAGATGTTGCGATGAC

TC TTGCTGTGGTTGCCCT

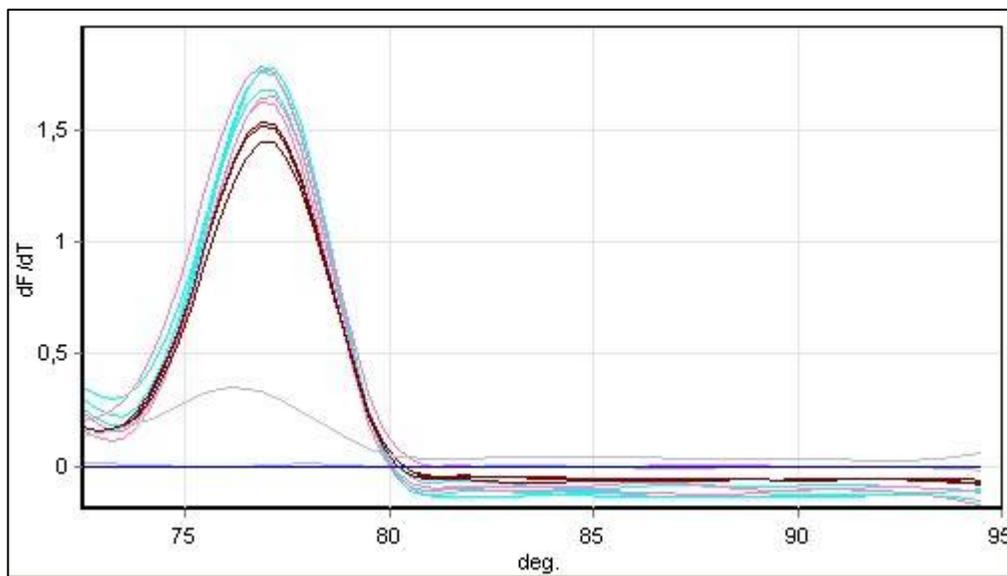
TC TTGCTGTGGTTGCCCT

ANEXO D

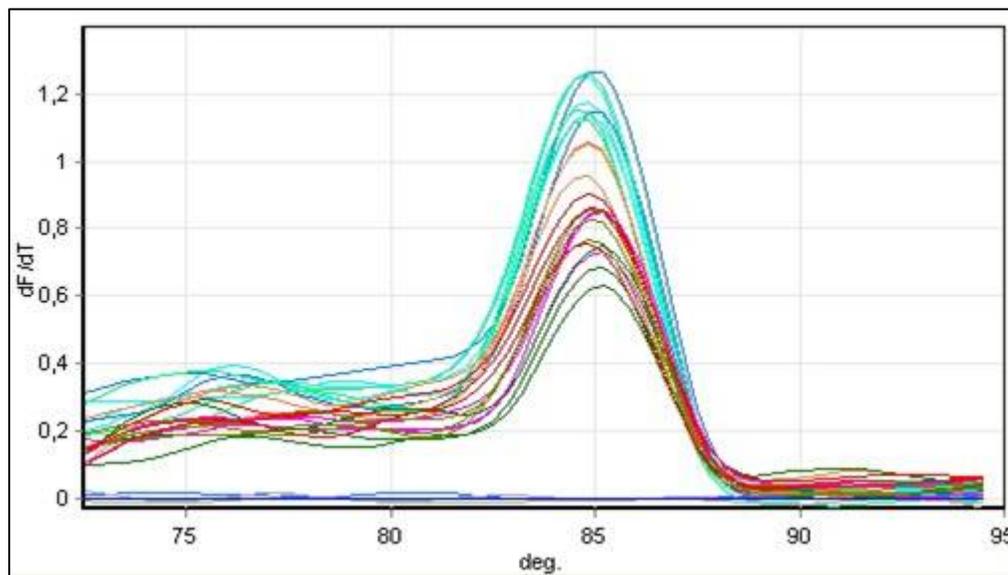
1. Curva de “melting” de uma das reações realizadas para análise de expressão do gene *EF1- α* .



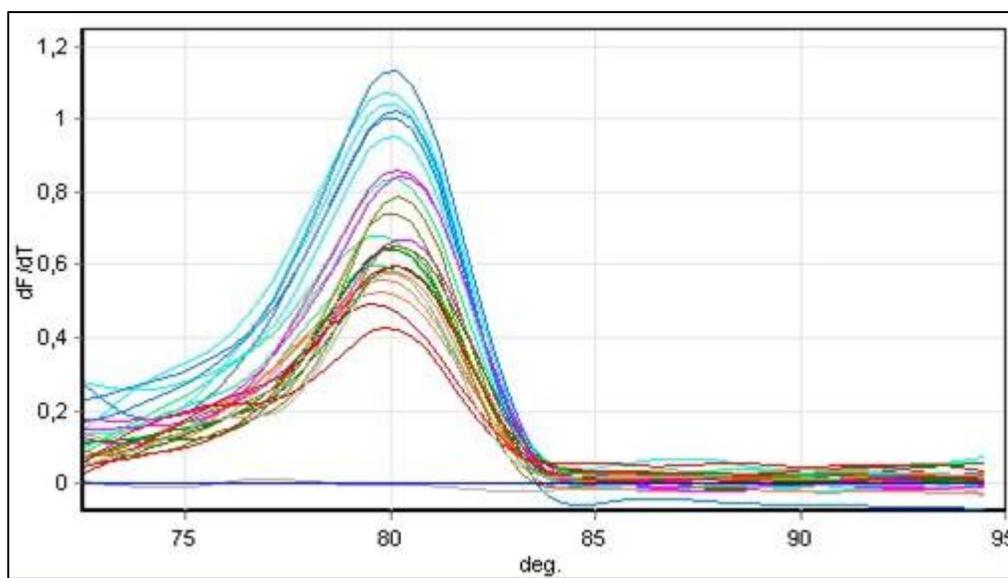
2. Curva de “melting” de uma das reações realizadas para análise de expressão do gene *EPSPS1*



3. Curva de “melting” de uma das reações realizadas para análise de expressão do gene *EPSPS2/EPSPS3* (primers EPSPS2art)



4. Curva de “melting” de uma das reações realizadas para análise de expressão do gene *EPSPS2/EPSPS3* (primers EPSPS3)



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)