

## ACÚMULO DE SHIQUIMATO EM BIÓTIPOS SUSCETÍVEIS E RESISTENTES DE BUVA PARA DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA AO HERBICIDA GLYPHOSATE

CARDINALI, V.C.B.<sup>1</sup>; DIAS, A.C.R.<sup>2</sup>, MUELLER, T.C.<sup>3</sup>, STEWART Jr, C.N.<sup>4</sup>, CHRISTOFFOLETI, P.J.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>ESALQ/USP - Piracicaba, SP, vanessacardinali@yahoo.com.br; <sup>2</sup>ESALQ/USP - Piracicaba, SP, anacarolina.r.dias@gmail.com; <sup>3</sup>University of Tennessee - Knoxville, TN - USA, tmueller@utk.edu; <sup>4</sup>University of Tennessee - Knoxville, TN - USA, nealstewart@utk.edu <sup>5</sup>ESALQ/USP - Piracicaba, SP, pjchrist@esalq.usp.br

### Resumo

A intensa utilização do glyphosate na agricultura, aliada às características biológicas da planta daninha *Conyza bonariensis* (buva) e sistemas de produção de baixa diversidade de métodos de controle de plantas daninhas têm selecionado populações resistentes. Um indicador da intensidade de atividade do glyphosate nas plantas é a medida do acúmulo de shiquimato nas células onde o herbicida atua. Portanto, populações de plantas daninhas resistentes (R) têm como consequência um acúmulo diferenciado de ácido shiquímico, quando comparadas com plantas suscetíveis (S). Portanto, o objetivo deste trabalho foi (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 foram submetidas à uma aplicação de glyphosate na dose equivalente a dose recomendada para o controle de buva (720 g e.a. ha<sup>-1</sup>). A coleta das plantas foi feita 2, 3, 4, 7 e 10 dias após o tratamento (DAT) com o herbicida. Nestes tempos de coleta também foram amostradas plantas não tratadas (testemunha). A extração do ácido shiquímico das folhas foi feita com HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>, 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, mostrando assim ser uma metodologia adequada para comprovação da resistência de plantas de *C. bonariensis* ao herbicida glyphosate. Como conclusão desta pesquisa, temos que o procedimento de isolamento e quantificação do ácido shiquímico a partir de plantas intactas tratadas com glyphosate é adequado para diferenciação entre plantas R e S de buva. A população R suspeita utilizada nesta pesquisa foi confirmada como resistente ao glyphosate. 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 glyphosate in agriculture, 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. 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 were submitted to a glyphosate application of the equivalent recommended rate of *C. bonariensis* control (720 g a.e.ha<sup>-1</sup>). 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 treated (control). The shikimic acid extraction of the leaves was done by HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>, 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 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. By the indirect evidences, the mechanism of resistance of the *C. bonariensis* studied is not related to insensitivity of EPSPs to glyphosate.

**Key Words:** *Conyza bonariensis*; HPLC; EPSPs; Selection

## Introdução

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). Embora os primeiros casos de *Conyza bonariensis* (buva) resistente ao glyphosate tenham ocorrido há cerca de sete anos, os mecanismos de resistência que ocorrem nestas manifestações ainda não foram bem esclarecidos.

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 e 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. 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 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.

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.

## Material e Métodos

O experimento foi instalado em casa de vegetação do “Plant Science Department” da Universidade do Tennessee – EUA, localizado em Knoxville, TN entre fevereiro e março de 2008. Foram utilizadas duas populações de buva, 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.

Quando as plantas atingiram nove folhas foi realizada aplicação de glyphosate na dose equivalente a 720 g de e.a. ha<sup>-1</sup>. 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 (N<sub>2</sub>) 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 e em seguida 15 mL de uma solução de HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> foram adicionados. Posteriormente, os frascos foram agitados durante 24 horas a 1500 rpm. Após a agitação, os extratos foram filtrados e 5 mL foram coletados. 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.

A quantificação do ácido shiquímico das plantas foi realizada através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo equipado com um detector de diodo (DAD). 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.

## Resultados e Discussão

Os resultados médios das avaliações da concentração de shiquimato nas populações que foram pulverizadas com glyphosate foram ajustados à equação linear simples, com bom ajuste dos dados, conforme figura 1.

Na tabela 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, que 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<sup>-1</sup> de matéria seca) para 18.980,14 mg de shiquimato kg<sup>-1</sup> 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. Foi observado que 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<sup>-1</sup> de matéria seca aos 2 DAA para 10.683,85 mg de shiquimato kg<sup>-1</sup> de matéria seca, indicando claramente que as plantas R estudadas têm 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 µg g<sup>-1</sup> 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.

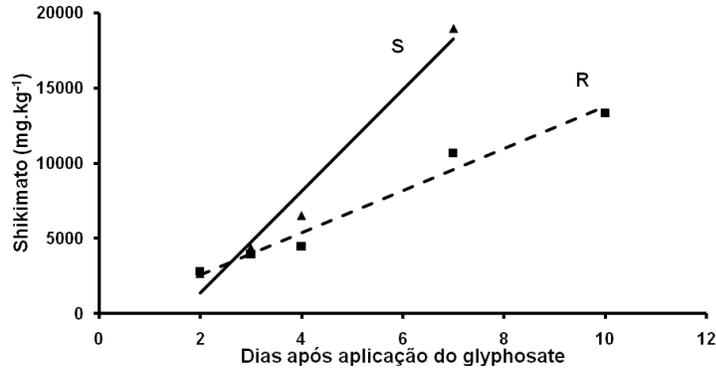


Figura 1 - Concentração de shiquimato nas plantas resistentes (R) e suscetíveis (S), sendo que as retas contínuas e tracejadas representam os valores contínuos ajustados pela equação de regressão linear para as plantas R e S respectivamente, e os símbolos triangulares e quadrados representam a média dos valores originais obtidos no experimento para as plantas R e S respectivamente.

Tabela 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 <sup>2</sup>
<b>Plantas suscetíveis</b>	-5411,22	3381,09	65,09	0,015	0,970
<b>Plantas resistentes</b>	3381,09	1408,88	110,54	0,0018	0,973

A tabela 2 representa a quantidade de shiquimato nas plantas sem aplicação do herbicida. As diferenças encontradas não devem ser atribuídas às 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 e Almeida, 2005), ou seja,  $720 \text{ g e.a ha}^{-1}$ .

Tabela 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

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.

Como pode ser observado na Figura 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 devem ser seguidos 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 considerada a dose recomendada de 720 g e.a. ha<sup>-1</sup> (Rodrigues e Almeida 2005).

Portanto, como conclusão deste estudo temos que o procedimento de isolamento e quantificação do ácido shiquímico a partir de plantas intactas tratadas com glyphosate é adequado para diferenciação entre plantas R e S de buva. Além disso, a população R suspeita utilizada nesta pesquisa foi confirmada como resistente ao glyphosate. Através de evidências indiretas, o mecanismo de resistência do biótipo de buva estudado não está relacionado com insensibilidade da EPSPs ao glyphosate.

#### **Agradecimentos**

Agradecemos a Monsanto do Brasil pelo apoio financeiro concedido.

#### **Literatura Citada**

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.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; GALLI, A.J.B.; CARVALHO, S.J.P.; MOREIRA, M.S.; NICOLAI, M.; 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.

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.

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.

MUELLER, T.C; MASSEY, J.H.; HAYES, R.M.; MAIN, C.L.; STEWART, Jr. 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, n. 3, p. 680–684, 2003.

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.