

**DINÂMICA POPULACIONAL E MECANISMOS DE TOLERÂNCIA
DE ESPÉCIES DE PLANTAS DANINHAS AO HERBICIDA
GLYPHOSATE**

PATRÍCIA ANDREA MONQUERO

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Fitotecnia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Julho – 2003

**DINÂMICA POPULACIONAL E MECANISMOS DE TOLERÂNCIA
DE ESPÉCIES DE PLANTAS DANINHAS AO HERBICIDA
GLYPHOSATE**

PATRÍCIA ANDREA MONQUERO

Engenheiro Agrônomo

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

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura
“Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de
Concentração: Fitotecnia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Julho - 2003

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Monquero, Patrícia Andrea
Dinâmica populacional e mecanismos de tolerância de espécies de plantas daninhas ao
herbicida glyphosate / Patrícia Andrea Monquero. - - Piracicaba, 2003.
99 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.
Bibliografia.

1. Banco de semente 2. Dinâmica populacional 3. Plantas daninhas 4. Tolerância ao herbicida
I. Título

CDD 632.58

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de forma direta ou indireta contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Nelson Monquero e Maria Helena Torres Monquero e ao meu irmão Marcos Alexandre Monquero, que sempre me apoiaram em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Pedro Jacob Christoffoleti da ESALQ/USP, pela sua amizade, orientação e confiança.

Ao Prof. Carlos Tadeu dos Santos Dias, do Departamento de Ciências Exatas da ESALQ/USP, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Rafael De Prado Amián da Universidad de Córdoba, Espanha, pela oportunidade e orientação na execução da tese.

Ao Prof. Antonio Heredia da Universidad de Málaga, Espanha, pelo auxílio nas análises de ceras epicuticulares e no uso do microscópio eletrônico de varredura.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP, Luiz Ferrari, Aparecido Mendes e Ony Rodrigues de Campos, pelo grande apoio durante a execução desta tese. Às secretárias Luciane, Bete, Célia, Helena e Sílvia, pela amizade e apoio.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de estudo para execução desta pesquisa.

Aos amigos Denise, Pepa, Loly, Guido, Juan (sobrino), Antonio, Gloria e Ramiro, pela ajuda e pelos momentos de descontração.

Ao Juliano pela paciência e carinho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Banco de sementes de plantas daninhas.....	4
2.1.2 Dinâmica do banco de sementes de plantas daninhas.....	8
2.1.3 Metodologia para estudo do banco de sementes.....	9
2.2 Herbicidas como fator de seleção de espécies de plantas daninhas.....	10
2.3 O herbicida glyphosate e os mecanismos de tolerância.....	11
2.4 Prevenção e manejo de plantas daninhas tolerantes ao glyphosate.....	16
3 DINÂMICA DO BANCO DE SEMENTES EM AREAS COM APLICAÇÃO FREQUENTE DO HERBICIDA GLYPHOSATE	
Resumo.....	20
Summary.....	21
3.1 Introdução	22
3.2. Material e Métodos.....	24
3.2.1 Semeadura das plantas daninhas.....	24
3.2.2 Tratamentos.....	25
3.2.3 Avaliações.....	25
3.2.3.1 Coletas das amostras do solo.....	25

3.2.3.2	Quantificação do banco de sementes pela técnica de separação de sementes.....	26
3.2.3.3	Quantificação do banco de sementes através de germinação em casa-de-vegetação.....	27
3.3	Resultados e Discussão.....	28
3.4	Conclusões.....	38
4	GLYPHOSATE EM MISTURA COM HERBICIDAS ALTERNATIVOS PARA O MANEJO DE PLANTAS DANINHAS TOLERANTES	
	Resumo.....	39
	Summary.....	40
4.1	Introdução.....	41
4.2	Material e Métodos.....	43
4.3	Resultados e Discussão.....	45
4.4	Conclusões.....	52
5	ABSORÇÃO, TRANSLOCAÇÃO E METABOLISMO DO GLYPHOSATE POR PLANTAS TOLERANTES E SUSCETIVEIS A ESTE HERBICIDA.	
	Resumo.....	53
	Summary.....	54
5.1	Introdução.....	55
5.2	Material e Métodos.....	57
5.2.1	Preparo da solução de glyphosate radiomarcado.....	57
5.2.2	Metodologia para os estudos de absorção e translocação do glyphosate.....	58
5.2.3	Metodologia para os estudos do metabolismo de glyphosate.....	60
5.3	Resultados e Discussão.....	61
5.3.1	Absorção e translocação do glyphosate.....	61
5.3.2	Estudo do metabolismo do glyphosate.....	67
5.4	Conclusões.....	72
6	CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFICIE FOLIAR E DAS CERAS EPICUTICULARES EM <i>C. beghalensis</i> , <i>Ipomoea grandifolia</i> e <i>Amaranthus hybridus</i> .	

Resumo.....	73
Summary.....	74
6.1 Introdução.....	75
6.2 Material e Métodos.....	76
6.2.1 Caracterização das ceras epicuticulares.....	76
6.2.2 Caracterização da superfície foliar por microscopia eletrônica de varredura.....	78
6.3 Resultados e Discussão.....	78
6.3.1 Caracterização das ceras epicuticulares.....	78
6.3.2 Caracterização da superfície foliar por microscopia eletrônica de varredura.....	81
6.4 Conclusões.....	84
7. CONCLUSÕES GERAIS.....	85
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	86

DINÂMICA POPULACIONAL E MECANISMOS DE TOLERÂNCIA DE ESPÉCIES DE PLANTAS DANINHAS AO HERBICIDA GLYPHOSATE

Autora: PATRÍCIA ANDREA MONQUERO

Orientador: Prof. Dr. PEDRO JACOB CHRISTOFFOLETI

RESUMO

Aplicações repetitivas do herbicida glyphosate podem resultar em mudanças nas populações de plantas daninhas, devido a uma pressão seleção sobre espécies de plantas daninhas tolerantes ao herbicida. No entanto, os mecanismos de tolerância dessas espécies não estão completamente compreendidos, e a elucidação desses mecanismos é fundamental nas recomendações de estratégias para o manejo de plantas daninhas tolerantes ao glyphosate. Sendo assim, os objetivos desta pesquisa foram: (i) avaliar a dinâmica do banco de sementes das espécies de plantas daninhas *Commelina benghalensis* L., *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Don e *Richardia brasiliensis* Gomez (tolerantes), *Amaranthus hybridus* L. e *Galinsoga parviflora* Cav. (suscetíveis), em áreas tratadas intensivamente com doses de glyphosate por dois anos consecutivos, (ii) caracterizar os mecanismos de tolerância *C. benghalensis* e *I. grandifolia* ao herbicida glyphosate

e (iii) estudar a eficácia de controle sobre as plantas daninhas tolerantes por herbicidas alternativos isolados e em mistura com glyphosate. Nos estudos de dinâmica do banco de sementes foram coletadas periodicamente amostras de solos de uma área com aplicação repetitiva do glyphosate para análise quantitativa e qualitativa através de extração das sementes e de germinação de sementes em casa-de-vegetação. Na caracterização dos mecanismos de tolerância, experimentos foram instalados para quantificar a absorção e a translocação de ^{14}C glyphosate pelas plantas *C. benghalensis*, *I. grandifolia*, *A. hybridus* e *Glycine max* resistente (R) e suscetível (S) ao glyphosate, às 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após tratamento (HAT); analisando-se, ainda, o metabolismo do glyphosate pelas plantas daninhas a 72 HAT. Cromatografia de camada delgada foi utilizada para determinar a composição química das ceras epicuticulares e microscopia eletrônica de varredura para a caracterização da superfície foliar das plantas daninhas. Experimento em casa de vegetação com os herbicidas alternativos carfentrazone, flumioxazin, sulfentrazone, chlorimuron-ethyl e bentazon foi conduzido para testar as interações aditivas, sinérgicas ou antagônicas com glyphosate no controle de plantas daninhas tolerantes. Os resultados foram: Ao final de dois anos de aplicação repetitiva de glyphosate houve um acréscimo do banco de sementes das plantas daninhas tolerantes, e um decréscimo no banco de sementes das plantas daninhas sensíveis ao glyphosate. A taxa de absorção e translocação do ^{14}C glyphosate em *A. hybridus* e *Glycine max* R e S foi maior que das demais plantas estudadas; *I. grandifolia* apresentou excelente taxa de absorção, entretanto, a translocação desta espécie foi reduzida. Em *C. benghalensis* a taxa de absorção foliar do glyphosate foi baixa, porém, não houve impedimento a translocação. Em *C. benghalensis* foi encontrado, além de glyphosate, o metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA). As ceras da cutícula foliar de *A. hybridus* e *I. grandifolia* apresentaram características predominantemente hidrofílicas, e a superfície foliar não apresentou tricomas, sendo observado uma grande quantidade de estômatos. As ceras epicuticulares

destas duas espécies de plantas daninhas apresentaram forma cristalina apenas em *A. hybridus*. Em *C. benghalensis* as ceras são relativamente mais hidrofóbicas, o que pode ter influenciado na menor penetração de glyphosate; sendo que, a superfície foliar apresenta tricomas e um número menor de estômatos, e estes estão recobertos por cera epicuticular.

POPULATION DYNAMIC AND TOLERANCE MECHANISMS OF WEED SPECIES TO THE GLYPHOSATE HERBICIDE

Author: PATRÍCIA ANDREA MONQUERO

Adviser: Prof. Dr. PEDRO JACOB CHRISTOFFOLETI

SUMMARY

Intensive applications of the herbicide glyphosate for weed control may result in the weed population changes, through selection pressure of the glyphosate tolerant weed species. However, the glyphosate tolerance mechanisms of these species are not completely understood, and the elucidation of these mechanisms is fundamental to the recommendations of alternative herbicides to glyphosate tolerant weed management. Therefore, the objectives of this research were: (i) to evaluate the weed seed bank dynamic of the species *Commelina benghalensis* L., *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Don and *Richardia brasiliensis* Gomez (tolerants to glyphosate), *Amaranthus hybridus* L. and *Galinsoga parviflora* Cav. (susceptibles to glyphosate), in areas that had been intensively treated with glyphosate rates for two consecutive years; (ii) to characterize the glyphosate tolerance mechanisms of *C. benghalensis* and *I. grandifolia*, and (iii) to study the efficacy of alternative herbicides in mixture with glyphosate in the control of tolerant weeds. The weed seed bank dynamic was evaluated through soil samples collected periodically,

and analysed quantitative and qualitatively by greenhouse germination test and seeds counting. Experiments were conducted to characterize the absorption and translocation of ^{14}C glyphosate by *C. benghalensis*, *I. grandifolia*, *A. hybridus* and *Glycine max* resistant (R) and susceptible (S) to glyphosate, at 2, 4, 8, 12, 24, 48 and 72 hours after treatment (HAT); and analysing the glyphosate metabolism by the weeds at 72 HAT. Thin layer chromatography was used to determine the chemical composition of the epicuticular layers and electronic microscopy to characterize the foliar surface of the weeds. Greenhouse experiment with the alternative herbicides carfentrazone, flumioxazin, sulfentrazone, chlorimuron-ethyl and bentazon were conducted to test additive, synergistic or antagonistic interactions with glyphosate on the control of the tolerant weeds. After two years of repetitive glyphosate application there was an increase in the weed seed bank of the tolerant species, and a decrease of the weed seed bank of the susceptible species to glyphosate. The rate of absorption and translocation of the ^{14}C glyphosate by *A. hybridus* and *Glycine max* R and S was higher than the other studied plants, likewise *I. grandifolia* presented an excellent rate of absorption, even though, the translocation of this species was reduced. In *C. benghalensis* the glyphosate rate of foliar absorption was low, however, there was a free translocation of the herbicide. No glyphosate metabolites were observed in *I. grandifolia* and *A. hybridus*, however, in *C. benghalensis* it was found, besides glyphosate, the aminophosphonic acid (AMPA) metabolite. The cuticle waxes of *A. hybridus* and *I. grandifolia* presented predominantly hydrophilic characteristics, and the foliar surface did not present trichomes, being observed a great amount of stomata. The epicuticular waxes of this two weed species presented crystal form only in *A. hybridus*. In *C. benghalensis* the waxes were relatively more hydrophobic, which could be influenced on lower penetration of glyphosate; the foliar surface present trichomes and fewer stomata, and these are recovered by epicuticular wax.

1 INTRODUÇÃO

Sementes e estruturas de propagação vegetativa de plantas, presentes no solo ou nos restos vegetais são denominadas como “Banco de Sementes” ou “Reservatório de Sementes” (Carmona, 1992).

O banco de sementes apresenta um papel ecológico importante no suprimento de novos indivíduos para as comunidades vegetais. Nos agroecossistemas, o banco de sementes, normalmente constitui um sério problema à atividade agrícola; pois garante infestações de plantas daninhas por longo período de tempo, mesmo quando é impedida a entrada de novas sementes de plantas daninhas na área (Cavers & Benoit, 1989).

O solo agrícola, segundo Lorenzi (1984) é um grande depósito de sementes, contendo de 2000 a 50.000 sementes m^{-2} nos 10 cm superficiais do solo. Entretanto, a composição florística de um solo agrícola, em determinado momento, não representa o potencial real de infestação, já que certas espécies necessitam de condições especiais para a quebra de dormência e germinação, além disso, as sementes que estão na superfície do solo também estão sujeitas a predação, parasitismo e transporte. É importante salientar que os diferentes sistemas de manejo do solo e das culturas influenciam decisivamente na composição florística de uma área e, portanto, no banco de sementes do solo.

Segundo Clements et al. (1996), o cultivo das áreas agrícolas tem efeito sobre a germinação e composição do banco de sementes de plantas daninhas. Um outro fator importante, devido a seletividade intra e interespecífica, é o uso contínuo de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação, que pode ocasionar mudanças na composição da comunidade de plantas daninhas selecionando espécies tolerantes ou biótipos resistentes (Ball, 1992).

Um dos herbicidas mais utilizados no controle de plantas daninhas, no Brasil e no mundo, é o glyphosate (N-fosfometil glicina), perfazendo cerca de 12% das vendas globais de herbicidas e apresentando mais de 150 marcas comerciais (Kruse et al., 2000). O herbicida glyphosate tem sido utilizado no meio agrícola por mais de vinte anos, sendo que em algumas áreas onde o uso deste herbicida é intensivo ocorreu a seleção de biótipos resistentes, como *Lolium rigidum* na Austrália (Gruys et al., 1999) e *Eleusine indica* na Malásia (Dill et al., 2000). O uso intensivo deste herbicida pode proporcionar também a seleção de espécies tolerantes, como *Convolvulus arvensis* (Degennaro & Weller, 1984); *Ipomoea* spp (Taylor, 1996); *Sesbania exaltata* (Jordan et al., 1997), entre outras. Os mecanismos propostos para explicar a tolerância das plantas daninhas ao glyphosate incluem, baixa absorção devido às diferenças físicas e/ou químicas da membrana cuticular, translocação reduzida, metabolismo diferencial e /ou maior atividade da enzima alvo.

A mistura do glyphosate com herbicidas com outros mecanismos de ação pode ser benéfica para o manejo de plantas daninhas tolerantes ou de biótipos resistentes, entretanto, são necessários estudos que determinem o potencial desta mistura de herbicidas, evitando efeitos antagônicos. Além disso, com relação ao efeito das culturas resistentes ao glyphosate no ambiente, é necessária a condução de experimentos procurando entender o impacto do uso destas plantas quando em monocultura, na diversidade ecológica, assim como a elucidação dos mecanismos de tolerâncias de algumas espécies de plantas daninhas que podem se tornar problemáticas em áreas com aplicação repetitiva deste herbicida.

Os objetivos deste trabalho foram: (i) avaliar o efeito de aplicações repetitivas do herbicida glyphosate sobre a dinâmica do banco de sementes de plantas daninhas tolerantes (*C. benghalensis*, *I. grandifolia*, *R. brasiliensis*) e suscetíveis (*A. hybridus* e *G. parviflora*) a este herbicida; (ii) Caracterizar os mecanismos de tolerância de *C. benghalensis* e *I. grandifolia* ao herbicida glyphosate, assim como, a absorção e translocação do glyphosate nas sojas

resistentes e suscetíveis a este herbicida; (iii) Determinar se a mistura do glyphosate com os herbicidas carfentrazone, flumioxazin, sulfentrazone, chlorimuron-ethyl e bentazon resulta em interações sinérgicas, aditivas ou antagonistas no controle de algumas espécies de plantas daninhas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Banco de sementes de plantas daninhas

Normalmente, o tamanho do banco de sementes das plantas daninhas é, comparativamente, maior em áreas agrícolas do que em áreas não agrícolas. Esta tendência é devido à estratégia das plantas daninhas de apresentar alta prolificidade de diásporos em ambientes perturbados. Kelley & Bruns (1975) compararam a densidade e a composição específica do banco de sementes entre uma área com pastagem e uma área adjacente cultivada por cinco anos consecutivos. A densidade total das sementes foi quadruplicada no solo cultivado quando comparado com o banco de sementes do solo com pastagem. Deuber (1992) listou exemplos da elevada capacidade reprodutiva de algumas plantas daninhas: *Amaranthus* spp (120.000 sementes/planta); *Galinsoga parviflora* (30.000 sementes/planta); *Portulaca oleracea* (53.000 sementes/planta). Sendo que, o número de flores e sementes de uma planta varia com as condições ambientais. Um estresse hídrico, por exemplo, pode acelerar o florescimento para garantir a perpetuação, porém haverá uma menor produção de flores e sementes. Muitas espécies de plantas daninhas apresentam reprodução por meio de partes vegetativas, como por exemplo: *Cyperus rotundus* (rizomas, tubérculos e bulbos basais), *Sorghum halepense* (rizomas) e *Cynodon dactylon* (rizomas e estolhos). Há ainda, espécies como a *C. benghalensis*, que se reproduz através de sementes aéreas, sementes subterrâneas e fragmentos do caule (Santos et al., 2001).

Alguns pesquisadores estimaram que a quantidade de sementes enterradas na camada arável do solo pode variar de 2.000 até 70.000 sementes m^{-2} em diferentes ecossistemas e localidades (Jonhson & Anderson, 1986). Os bancos de sementes são espacialmente muito heterogêneos e há também variações na distribuição vertical das sementes nos solos (Holub, 1994).

A dispersão de diásporos pode ocorrer por meios próprios (autocoria) ou com o auxílio de agentes externos (alocoria). Macedo (1977), listou os seguintes tipos de dispersão: anemocórica (dispersão pelo vento); barocórica (dispersão pelo peso das sementes); diszoocórica (dispersão pelos animais); autocórica (dispersão com o emprego de estruturas especiais de propulsão); antropocórica (dispersão pelo homem); primatocórica (dispersão pelos primatas) e ornitocórica (dispersão pelos pássaros). O homem é um importante agente dispersor de sementes de plantas daninhas, seja diretamente, pela utilização de sementes ou mudas contaminadas, ou indiretamente, como por exemplo, através do uso de máquinas e implementos que não foram suficientemente limpas e que podem distribuir sementes de plantas daninhas de uma área a outra.

A germinação das sementes é o resultado do balanço entre condições ambientais favoráveis e características intrínsecas das sementes, compreendendo uma seqüência ordenada de atividades metabólicas, que resulta na retomada do desenvolvimento do embrião, originando assim, uma plântula. As sementes viáveis e não dormentes germinam quando há disponibilidade de água, oxigênio, temperatura e luz. A maior parte das sementes das plantas daninhas é ortodoxa e, portanto, podem ser quiescentes, se alguns destes fatores ambientais limitarem a germinação, ou podem estar em estado de dormência.

Os diásporos das plantas daninhas podem ser dotados de mecanismos de dormência variáveis e de elevada longevidade. De acordo com Foley (2001), dormência é uma "falha" temporária na viabilidade das sementes para germinar mesmo tendo todas as condições ambientais favoráveis. O período de

dormência pode ser de poucos dias a alguns meses ou, estender-se por vários anos. A dormência distribui a germinação ao longo do tempo, garantindo o potencial de regeneração do banco de sementes mesmo em condições ambientais adversas à sobrevivência das espécies e de perturbação contínua do solo para fins de cultivo (Carmona, 1992)

A dormência de sementes tem sido classificada por diversos autores em dormência primária e dormência secundária. A dormência primária ocorre durante a maturação das sementes. Este tipo de dormência é importante para impedir que sementes germinem quando ainda estão ligadas às plantas mãe. A dormência secundária ocorre após a dispersão das sementes maduras, sendo induzida por fatores naturais ou artificiais (Chadoeuf-Hannel, 1985).

As principais causas da dormência são: impermeabilidade do tegumento a água e/ou oxigênio, embrião dormente, restrição mecânica ao desenvolvimento do embrião, imaturidade fisiológica do embrião, e presença de inibidores químicos. Algumas sementes para germinarem precisam passar por processos de “quebra de dormência”. Por exemplo, *Oryza sativa* e *Avena fatua*, normalmente, requerem para germinar, temperaturas altas e baixa umidade (Leopold et al., 1988). *Ambrosia trifida* e *Setaria viridis* necessitam de baixas temperaturas e estratificação (Ballard et al., 1996). Algumas plantas daninhas possuem sementes pequenas que necessitam de luz para germinar, sendo consideradas, fotoblásticas positivas, como exemplo, sementes de *Sida rhombifolia* e *S. spinosa*.

Em condições de campo a dormência se torna um problema de difícil solução. Os métodos que são empregados para quebra de dormência em laboratório não são práticos e adequados em áreas agrícolas. As práticas culturais, como preparo de solo, podem promover a dormência em algumas espécies e provocar a quebra de dormência em outras. Algumas alternativas de manejo que têm mostrado resultados satisfatórios no controle de plantas daninhas são o plantio direto e o preparo do solo à noite, pois evitam a germinação de sementes cujo mecanismo de dormência seria a sensibilidade à

luz. As sementes fotoblásticas positivas seriam mantidas em seu estado de repouso fisiológico com o não revolvimento do solo em áreas de plantio direto, contribuindo para o seu decréscimo.

A longevidade das sementes no solo é variável em função da espécie, da profundidade de enterrio, do manejo do solo e das condições climáticas. Burnside et al. (1986) constataram que sementes de *Setaria viridis*, *S. lutescens* e *S. primilia*, persistiram por mais de dezesseis anos quando enterradas a 20 cm de profundidade.

Dawson & Bruns (1975) enterraram sementes de *Setaria viridis*, *S. glauca* e *Echinochloa crus-galli* em três diferentes profundidades (2,5; 10 e 20 cm) resgatando-as após três anos. Constataram que as sementes de todas estas espécies tiveram maior longevidade em função do aumento da profundidade de enterrio.

Roberts (1983) observou que taxas de deterioração de até 45% ocorreram quando o preparo de solo foi realizado várias vezes ao ano. Por outro lado, o não revolvimento do solo proporcionou as menores taxas de deterioração de sementes, cerca de 25%.

No sistema de plantio direto, onde há uma maior concentração de sementes na superfície do solo, ocorre um decréscimo do banco de sementes, devido à indução a germinação, a perda de viabilidade ou a predação e parasitismo. Yenish et al. (1992), observaram que sementes de *Chenopodium album* coletadas na superfície do solo, depois de instalado o sistema de plantio direto, germinaram 40% menos que as sementes coletadas a maiores profundidades após a aração.

Portanto, a elevada capacidade reprodutiva das plantas daninhas e a alta longevidade das sementes, associadas com os mecanismos de dormência, levam ao acúmulo de sementes viáveis em solos agrícolas, formando o banco de sementes.

2.1.2 Dinâmica do banco de sementes de plantas daninhas

O tamanho e a composição botânica das espécies que compõem uma população de sementes do solo, num dado momento, é o resultado do balanço entre a entrada de novas sementes e perdas por germinação, deterioração, parasitismo, predação e transporte (Hoffman et al., 1998). Os principais meios de enriquecimento do banco de sementes são: produção de novas sementes por plantas remanescentes de controle, transporte de sementes por meio de maquinários, animais, vento, água e o homem. O decréscimo do banco de sementes no solo varia em função da espécie, dormência, condições ambientais, presença de microorganismos e predadores, sendo que a principal forma de decréscimo é a germinação das sementes. A germinação é bastante variável ao longo do tempo, ocorrendo fluxos de emergência das plantas daninhas em determinados períodos do ano. Estes fluxos são resultantes de condições ambientais favoráveis e da habilidade das sementes viáveis em responder a estes estímulos. As plantas daninhas anuais que ocorrem no verão, por exemplo, necessitam das baixas temperaturas do inverno para a quebra de dormência e posterior germinação durante a primavera. Por outro lado, as plantas anuais que ocorrem no inverno necessitam das altas temperaturas do verão anterior para o estimular a germinação durante o outono (Carmona, 1992).

Os bancos de sementes, em função do padrão de germinação e estabelecimento de plântulas foram classificados por Thompson & Grime (1979) em transitórios e persistentes. No primeiro tipo, a germinação ocorre dentro do período de um ano após a dispersão e no segundo tipo a germinação das sementes dispersas excede a esse período. As espécies que apresentam bancos transitórios não acumulam sementes no solo, sendo raras as espécies de plantas daninhas que fazem parte deste tipo de banco, dentre elas pode-se citar *Avena fatua*, *Alopecurus myosuroides* e *Matriarca perflorata* (Barralis et al., 1988). As espécies que formam o banco transitório estão adaptadas a explorar o espaço deixado por danos e morte da vegetação.

O tamanho e a composição do banco de sementes é reflexo de todo o manejo adotado no controle de plantas daninhas na área e uma redução neste banco pode significar um menor problema com plantas daninhas nas áreas agrícolas, e, portanto, economia para os agricultores, especialmente com herbicidas, além de um menor impacto ambiental, com menor utilização de produtos químicos.

2.1.3 Metodologia para estudo do banco de sementes

Uma predição precisa da emergência de sementes de plantas daninhas que constitui o banco de sementes permitiria aos agricultores um planejamento de controle mais eficiente e evitaria a aplicação inadequada de herbicidas em condições de pré-emergência das plantas daninhas (Cardina & Sparrow, 1996). A estimativa qualitativa e quantitativa das sementes no banco de sementes é invariavelmente acompanhada pela germinação direta das amostras do solo e extração física das sementes acompanhada por ensaios de viabilidade (Luschei et al., 1998).

A eficácia destes métodos tem sido objeto de muitos estudos (Cardina & Sparrow, 1996; Gross, 1990; Roberts, 1981). Existem vários problemas relacionados com as metodologias de estudo de banco de sementes das plantas daninhas. Dentre eles, destaca-se o número correto de amostragens do solo, métodos adequados para extração e separação das sementes das amostras do solo e cálculo da porcentagem de germinação destas sementes.

Segundo Benoit et al. (1989) a forma mais correta para se determinar o número ideal de amostras é através da relação de variância, na qual quanto maior o número de sementes em uma amostra por área, menor será a variância e o número de amostras necessárias para estimar o banco de sementes. Com relação a profundidade recomenda-se trabalhar nos primeiros 20 cm do perfil do solo, onde pode se encontrar 90% das sementes (Buhler et al., 1997).

Para a quantificação do banco de sementes, um dos métodos mais utilizados é a enumeração da emergência de plantas a partir de amostras de solos colocadas em bandejas em casa de vegetação (Roberts, 1981).

Buhler & Maxwell (1993) aperfeiçoaram a separação física, que antes era somente feita através de peneiramento do solo, com a utilização de soluções de alta densidade, como o carbonato de potássio (K_2CO_3), seguido de centrifugação. Nesta metodologia há uma separação dos constituintes orgânicos do solo que são recolhidos para posterior identificação. Houve também a constatação que a exposição das sementes a 3,2 M de K_2CO_3 por períodos menores que 30 minutos não afeta a germinação das sementes. Porém, em trabalhos posteriores, Luschei et al. (1998) verificaram que ao centrifugar as amostras na solução de carbonato de potássio, ocorreu uma redução da germinação de *Setaria faberi* de 94% para 52%. Isto ocorre devido ao dano nas sementes devido ao alto pH da solução em conjunto com o aumento da pressão hidrostática devido a centrifugação.

2.2 Herbicidas como fator de seleção de espécies de plantas daninhas

A utilização de herbicidas para o manejo de plantas daninhas é uma prática que tem se expandido em todas as condições agrícolas e não agrícolas. É um dos métodos mais eficientes e em muitos casos, o mais econômico; sendo que, para algumas culturas a aplicação de herbicidas é praticamente o único método de controle utilizado.

Esses produtos, quando utilizados por vários anos, podem permitir que certas espécies ou biótipos sejam selecionados e se adaptem. Outros métodos de controle de plantas daninhas, também podem exercer ação seletiva, como os meios mecânicos de controle que podem selecionar espécies de propagação vegetativa.

O emprego intensivo de herbicidas com mecanismos de ação similares pode selecionar espécies tolerantes ou biótipos resistentes, do mesmo modo,

herbicidas com residuais curtos podem selecionar espécies com germinação tardia. Segundo Wilson (1988), a aplicação repetitiva de herbicidas com o mesmo espectro de ação na cultura do arroz por quatro anos têm conduzido à predominância de *Eleocharis kuroguwae*, *Cyperus serotinus* e *Scirpus juncooides* em supressão às plantas daninhas dicotiledôneas. Fryer et al. (1982) constataram que o uso contínuo do 2,4-D em áreas produtoras de cereais na Inglaterra aumentou a frequência de plantas daninhas monocotiledôneas como *Avena* spp e *Alopecurus myosuroides*, que não são controladas por este herbicida.

2.3 O herbicida glyphosate e os mecanismos de tolerância

O glyphosate é um herbicida não seletivo, de ação sistêmica usado no controle de plantas daninhas anuais e perenes, não apresentando atividade residual no solo (Rodrigues & Almeida, 1998). Algumas características físico - químicas do herbicida glyphosate podem ser vistas na Tabela 1 (Franz, 1984). A eficácia do glyphosate depende da eficiência de uma série de processos, como a retenção do herbicida pelas folhas, a penetração adequada, a translocação e a inibição do sitio alvo.

Tabela 1. Características físico-químicas do herbicida glyphosate

Nome comum	Glyphosate
Nome químico (IUPAC)	N-(Fosfonometil) glicina
Formula molecular	C ₃ H ₈ NO ₅ P
Peso molecular	169,1
Solubilidade em água	10000 ppm a 25°C
Pressão de Vapor	Praticamente zero
Log K _{ow}	-4,1
pKa	pK ₁ 2,227; pK ₂ 5,57; pK ₃ 10,86

O glyphosate é lentamente absorvido pela cutícula, sendo necessário um período de seis horas sem chuvas após a aplicação para haver um controle satisfatório de plantas suscetíveis. As novas formulações do glyphosate apresentam surfactantes que conferem maior afinidade da molécula aos lipídios, facilitando, assim, a absorção foliar (Rodrigues & Almeida, 1998). A difusão é o mais provável processo de transporte dos solutos através da cutícula. Fatores que influenciam neste processo incluem a temperatura, formulação do herbicida, a integridade, espessura e composição química da camada cuticular e o tipo de cera epicuticular. O gradiente de concentração entre a região de deposição do produto e o interior da planta também pode influenciar na taxa de absorção, como demonstrado por Erickson & Duke (1981), que observaram que o aumento na concentração do glyphosate na calda ocasionava maior penetração deste herbicida através das membranas cuticulares isoladas de *Agropyron repens*.

A penetração do glyphosate nas células é mediada por proteínas transportadoras de fosfato, presentes no plasmalema (Mervosh & Balke, 1991). O glyphosate é transportado nas plantas até os tecidos onde se encontra o sítio de ação, através do floema, onde é distribuído simplásticamente, embora também ocorra movimento apoplástico. O controle de plantas daninhas perenes requer que o produto seja translocado até as partes subterrâneas, portanto, a aplicação deve ser realizada em estádios vegetativos próximos e anteriores a floração para maximizar a translocação. Os fatores que influenciam na translocação do glyphosate são: espécie, estágio de desenvolvimento da planta, e condições ambientais.

Vários trabalhos científicos descrevem como único mecanismo de ação do glyphosate a inibição da 5-enolpiruvilshiquimato fosfato sintetase (EPSPs) (E.C. 2.5.1.19). Como consequência desta inibição, não ocorre a síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano e de compostos secundários como alcalóides, coumarinas e flavonóides (Anderson & Johnson, 1990; Amrhein et al., 1980; Arnaud et al., 1994 e Bently, 1990). A EPSPs

catalisa a reação de shikimato-3-fosfato (SHKP) e fosfoenolpiruvato (PEP) para a produção de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) e fosfato inorgânico (Pi) e posteriormente do corismato que é o substrato na síntese dos aminoácidos mencionados. A reação descrita segue a seguinte ordem: SHKP se une primeiro formando o complexo EPSPs-SHKP, seguindo, então, a união da PEP, que ao final produzirá EPSP. Em plantas suscetíveis tratadas com o glyphosate, a molécula do herbicida forma o complexo inativo EPSPs-SHKP-glyphosate, impedindo, portanto, a ligação da PEP (Gruys et al., 1993; Devine, et al., 1993).

No final da década de setenta, o uso de glyphosate no Brasil, impulsionou o controle químico das plantas daninhas no sistema de semeadura direta, onde há a manutenção da palhada na superfície do solo em plantios de culturas como milho e soja (Kruse et al., 2000). Como o glyphosate é rapidamente adsorvido pelos colóides de argila e húmus do solo, a ponto de não ficar disponível para ser absorvido pelas raízes das plantas, permite a semeadura das culturas logo após a aplicação.

O coeficiente de partição octanol/água do glyphosate é baixo (log Kow = -4,1), indicando pouca afinidade a lipídios e conseqüentemente baixa bioacumulação. Esse fator, além do amplo espectro de controle de plantas daninhas do glyphosate é um estímulo no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas para resistir a ação deste herbicida. Embora ainda não registrada no Brasil, o uso de culturas transgênicas resistentes ao glyphosate, tem se expandido em alguns países, como Argentina e Estados Unidos da América do Norte, aumentando assim, o uso deste produto no meio agrícola.

Algumas espécies de plantas daninhas têm sido relatadas como sendo tolerantes as doses recomendadas do glyphosate, como por exemplo, *Ambrosia artemisiifolia* (Kapusta et al., 1994), *Sesbania exaltatta* (Raf) Rydb, *Ipomoea spp.* (L.) Jacq, (Jordan et al., 1997; Lich et al., 1997) Na Argentina, Papa et al. (2002), listaram as seguintes espécies de plantas daninhas tolerantes e que se tornaram problemas em áreas cultivadas por soja transgênica: *Parietalia debilis*,

Petunia auxiliares, *Verbena litoralis*, *Verbena bonariensis*, *Hybanthus parviflorus*, *Iresine difusa*, *Commelina erecta* e *Ipomoea* spp.

No Brasil a tolerância ao glyphosate tem sido detectada em algumas espécies de plantas daninhas (Santos et al., 2001; Durigan et al., 1988). Entretanto, a razão para esta tolerância diferencial não é ainda totalmente compreendida.

Há vários exemplos na literatura, que demonstram que a tolerância de plantas daninhas ao glyphosate é devido a uma penetração ou a uma translocação diferencial (D'Anieri et al., 1990; Sandberg et al., 1980). Satichivi et al. (2000) observaram que a absorção foliar de ¹⁴C-glyphosate, 72 horas após a aplicação foi maior na planta daninha *Setaria faberi* L. (43%) do que em *Abutilon theophrasti* (26%). Estes mesmos pesquisadores constaram que a adição de 1% de sulfato de amônio aumentava a absorção de glyphosate em ambas espécies estudadas.

A absorção e translocação diferencial de glyphosate foram citadas como a principal razão para a tolerância diferencial de plantas como *Apocynum cannabinum* L., *Asclepias syriaca* L. e *Abutilon theophrasti*, (Wyrill & Burnside, 1976).

A membrana cuticular das plantas consiste de uma camada de ceras epicuticulares, ceras embebidas, cutinas e pectinas. As ceras epicuticulares podem atuar como principal barreira à penetração de produtos químicos (Liakopoulos et al., 2001). A deposição, distribuição e retenção das gotas pulverizadas são afetadas pela extensão da cobertura e natureza química das ceras epicuticulares e pela rugosidade da superfície foliar. Altos níveis de rugosidade nas folhas podem resultar em interfaces ar/líquido, os quais podem inibir a penetração de herbicidas (Kirkwood, 1999). Ceras epicuticulares e cuticulares contêm longas cadeias de alcanos, entretanto, em pequenas porcentagens, e de outras substâncias como álcoois, aldeídos, ácidos graxos e cetonas. As ceras epicuticulares podem se apresentar na forma cristalina, amorfa ou intermediária. A quantidade de ceras epicuticulares pode ser alterada

por fatores ambientais, como a intensidade luminosa, fotoperíodo, umidade e temperatura, enquanto, que a composição química das ceras é variável com a espécie e idade da planta (Hess & Chester, 2000). As principais funções fisiológicas da cutícula, segundo Heredia et al. (1998) são: reduzir a perda incontrolada de água e solutos, constituir uma barreira mecânica que impeça a penetração de hifas de fungos e ataque de insetos, proteger os tecidos de possíveis danos mecânicos, refletir e atenuar a radiação ultravioleta, atuar como compartimento de compostos lipofílicos, atuar como meio de percepção, para insetos e microorganismos através de sinais químicos emitidos pela planta e atuar como habitat para os microorganismos que vivem na superfície das folhas.

Segundo Westwood et al. (1997), um dos prováveis mecanismos de tolerância das plantas ao glyphosate é o metabolismo diferencial. No entanto, alguns estudos sugerem que o metabolismo do glyphosate não ocorre (Mallik et al., 1989), enquanto outros estudos demonstram o contrário. As espécies vegetais possuem diferentes graus de metabolização dos herbicidas inibidores da EPSPs. Um estudo com soja (*Glycine max* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), milho (*Zea mays* L) e tabaco (*Nicotiana tabacum* L) demonstraram a presença de ácido aminometilfosfônico (AMPA) como o único metabólito detectável do glyphosate (Komoba et al., 1992). Uotila et al. (1995) demonstraram que plantas de trigo (*T. aestivum* L.), milho (*Z. mays* L) e ervilha (*Pisum sativum* L.) quando tratadas com glyphosate, apresentavam aumento na atividade da glutathione S-transferase, sugerindo assim, que este sistema metabólico pode estar envolvido na degradação do glyphosate em plantas. Entretanto, existem poucas informações na literatura sobre o metabolismo do glyphosate em plantas. As pesquisas têm sido feitas com o herbicida radiomarcado e técnicas cromatográficas para determinar a extensão do metabolismo e para caracterizar os metabólitos. Gottrup et al. (1976), utilizando cromatografia de camada delgada, não detectaram metabólitos do glyphosate nos extratos de raízes e caules das plantas *Cirsium arvense* e *Euphorbia escula* tratadas com ¹⁴C-

glyphosate. Rueppel et al. (1977), entretanto, detectou metabólitos de glyphosate em soja (*Glycine max* L.) e milho (*Zea mays* L.), verificando quatro semanas após tratamento com o glyphosate radiomarcado, que a maioria do ^{14}C estava na forma original, a exceção do milho que apresentou níveis de (AMPA). Os estudos realizados com glyphosate radiomarcado em plantas possibilitam sugerir a seguinte rota de degradação do herbicida: (i) primeiro o glyphosate é transformado em AMPA, (ii) depois em moléculas com dois átomos de carbono, provavelmente o glioxalato. O AMPA é degradado via transaminação formando formil fosfonato, o qual se descompõe em formaldeído e fosfato inorgânico. O formaldeído pode então ser incorporado diretamente a metabólitos naturais ou posterior a decomposição a CO_2 que subsequente pode ser fixado através da fotossíntese. (Coupland, 1985).

2.4 Prevenção e manejo de espécies de plantas daninhas tolerantes ao glyphosate.

O planejamento e escolha das estratégias de manejo de espécies de plantas daninhas tolerantes ao glyphosate devem ser feitos de forma criteriosa. O aspecto mais importante é a recomendação de práticas e sistemas de produção em que a pressão de seleção de espécies tolerantes a determinado herbicida seja reduzida

Para prevenir a seleção de espécies de plantas daninhas tolerantes ao glyphosate, em áreas repetitivamente tratadas com esse herbicida, como é o caso das áreas cultivadas por plantas transgênicas resistentes ao glyphosate e das áreas de plantio direto, recomenda-se medidas como a rotação de culturas e a mistura do herbicida glyphosate com herbicidas de diferentes mecanismos de ação (Kruse et al., 2000). Várias misturas de glyphosate com outros herbicidas têm resultado em interações antagônicas ou sinérgicas (Lich et al., 1997). A interação de herbicidas em combinação é descrita como antagonística se o controle obtido na mistura é menor do que a somatória do controle quando

os herbicidas são utilizados isoladamente, ou como sinérgica se o controle da mistura é maior. Quando o controle das plantas daninhas pela mistura é equivalente a somatória do controle dos herbicidas isoladamente, a resposta é considerada aditiva (Lich et al., 1997).

As misturas em tanque de glyphosate com herbicidas do grupo químico dos difeniléteres, como lactofen ou oxyfluorfen (em doses subletais), proporcionaram resultados sinérgicos no controle das plantas daninhas *Malva parviflora* L. (Wells & Appleby, 1992) e *Cyperus esculentus* L., (Pereira & Crabtree, 1986), respectivamente. Os herbicidas lactofen e oxyfluorfen causaram rupturas na membrana plasmática aumentando a absorção do ¹⁴C-glyphosate o que levou a um maior acúmulo de shiquimato.

De acordo com Lich et al. (1997) a mistura de glyphosate com os herbicidas bentazon ou fomiclorac resultou em respostas aditivas no controle de *Abutilon theophrasti* L.. Segundo estes autores, as interações antagônicas são observadas mais freqüentemente quando se usam os herbicidas chlorimuron-ethyl, imazethapyr ou thifensulfuron em mistura com glyphosate.

O controle de *Elytrigia repens* L. pelo glyphosate foi menor quando se adicionava o herbicida linuron (Selleck & Baird, 1981). A aplicação de metribuzin mais chlorimuron-ethyl com o glyphosate, resultou em interação antagônica sobre o controle das plantas daninhas *Ipomoea hederacea* Gray. e *Sorghum halepense* (L) Pers. A adição de dicamba ou bromoxynil ao glyphosate, diminuiu a fitotoxicidade do glyphosate sobre várias plantas daninhas de folha larga (O'Sullivan & O'Donovan, 1980).

Uma outra forma utilizada para o controle efetivo de plantas daninhas tolerantes ao glyphosate como *Ipomoea grandifolia*, *Commelina benghalensis*, *Spermacoceae latifolia*, é a aplicação seqüencial do herbicida glyphosate. Nas áreas de soja transgênicas do sul dos Estados Unidos da América do Norte, segundo Norsworthy et al. (2001), a aplicação seqüencial já é uma rotina, sendo que normalmente a primeira aplicação ocorre quando as plantas daninhas estão com 10-20 cm de altura e a segunda aplicação ocorre entre 15 a 20 dias após a

primeira aplicação.

No 23º Congresso brasileiro da ciência das plantas daninhas (2002), foram apresentados mais de 15 trabalhos com aplicação seqüencial de glyphosate sobre plantas daninhas tolerantes.

Embora diversos trabalhos demonstrem as vantagens da aplicação seqüencial de glyphosate em relação a uma única aplicação sobre o controle das plantas daninhas de difícil controle, até o momento, não existem trabalhos que demonstrem cientificamente as razões desta melhor eficácia.

As estratégias não químicas também devem ser consideradas no manejo de plantas daninhas. A rotação de culturas, particularmente aquelas com diferentes ciclos de vida, reduz o sucesso intrínseco das plantas daninhas, que estão sincronizadas com a cultura, implicando na variação dos padrões de uso do solo e da interferência das plantas daninhas. Técnicas que reduzem o banco de sementes de plantas daninhas podem ser utilizadas tais como: pastagem ou produção de forrageiras, períodos de pousio utilizando herbicidas não-seletivos, utilização de adubos verdes, queima de resíduos da cultura ou de plantas daninhas após a colheita (Powles & Holtum, 1994).

Para Boerboom (1999) as conseqüências da rotação de culturas são: i) algumas culturas não utilizam herbicidas diminuindo a pressão de seleção; ii) a utilização de herbicidas com diferentes mecanismos de ação e; iii) os diferentes ciclos de vida das culturas e praticas de produção, que poderiam afetar a dinâmica da população de plantas daninhas. É improvável que a rotacão de culturas elimine o uso de herbicidas e a pressão de seleção em sistemas de cultivo, mas pode ser utilizado para reduzir a utilização de herbicida no decorrer dos anos.

O método cultural consiste na utilização de medidas e procedimentos objetivando a prevenção de infestações e disseminação de plantas daninhas, bem como o fortalecimento da capacidade competitiva da cultura, representada pelo seu rápido estabelecimento e desenvolvimento. O uso de práticas alternativas de manejo de plantas daninhas inclui: cultivo de culturas mais

competitivas; escolha de cultivares adaptadas a região junto com plantio na época, espaçamento e densidade adequadas; não utilizar material orgânico provenientes de locais infestados de plantas daninhas; uso de cobertura morta; uso de sementes certificadas, limpeza dos equipamentos de preparo e colheita através de bombas de água ou ar comprimido para remover as sementes, quarentena de animais e utilização de quebra ventos; limpeza de beiras de estrada, carreadores e terraços existentes nas áreas; considerar os efeitos alelopáticos positivos, na escolha das culturas em rotação; consórcios e plantas supressoras e; optar por culturas com maior produção de massa e de rápido crescimento inicial.

3 DINÂMICA DO BANCO DE SEMENTES EM ÁREAS COM APLICAÇÕES REPETITIVA DE GLYPHOSATE

Resumo

Embora o herbicida glyphosate seja considerado não seletivo, várias espécies de plantas daninhas apresentam certo grau de tolerância às doses recomendadas. No Brasil, já existem relatos de seleção de espécies de plantas daninhas tolerantes ao glyphosate em áreas com o uso intensivo deste herbicida. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência da aplicação repetitiva do herbicida glyphosate sobre a dinâmica do banco de sementes das plantas daninhas tolerantes: *Commelina benghalensis* L., *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Don e *Richardia brasiliensis* Gomez; e das plantas daninhas susceptíveis: *Amaranthus hybridus* L. e *Galinsoga parviflora* Cav. O experimento foi conduzido durante 28 meses em áreas experimentais do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. Partindo de uma densidade de 100 plantas.m⁻² de cada espécie, glyphosate foi aplicado periodicamente em pós-emergência sobre as plantas daninhas adultas nas doses de 0; 0,36; 1,44 e 2,88 kg e.a.ha⁻¹. O banco de sementes do solo foi estimado através da avaliação de emergência direta das plântulas e extração física das sementes. O banco de sementes das plantas daninhas tolerantes ao glyphosate sofreu um aumento significativo, principalmente nas menores doses. Por outro lado, o banco de sementes das espécies susceptíveis diminuiu ao

longo do tempo mesmo nas menores doses do glyphosate.

SEED BANK DYNAMIC IN AREAS WITH REPETITIVE APPLICATIONS OF GLYPHOSATE

Summary

Even though the glyphosate is considered a non-selective herbicide, several weed species show a certain degree of tolerance to recommended rates. In Brazil, it has been reported weed species tolerance to glyphosate in areas with repetitive applications of this herbicide. Therefore, the objective of this research was to evaluate the influence of the herbicide glyphosate on the seedbank dynamic of the tolerant weeds *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* and *Richardia brasiliensis*; and on the susceptible species: *Amaranthus hybridus* and *Galinsoga parviflora*. The experiment was monitored during two years in the experimental area of Plant Production Department of ESALQ/University of São Paulo, Brazil. At initial densities of 100 plants.m⁻² of each species, glyphosate was sprayed periodically in post-emergence conditions at the rates of 0, 0.36, 1.44 and 2.88 kg a.e.ha⁻¹. The seedbank in the soil was estimated through seedling emergence evaluation and physical extraction from the soil. Seedbank of the tolerant species increased specially at lower rates of glyphosate. On the other hand, weed seedbank of susceptible species decreased during the experiment, even at lower rates.

3.1 Introdução

A denominação “Banco de Sementes” ou “Reservatório de Sementes” no solo tem sido usada na literatura internacional, segundo Carmona (1992), para descrever o montante de sementes não dormentes e outras estruturas de propagação presentes no solo ou nos restos vegetais. Alguns pesquisadores estimaram que a quantidade de sementes presentes na camada arável do solo pode variar de 2.000 até 70.000 sementes.m⁻² (Johnson & Anderson, 1986) em diferentes agroecossistemas e localidades. Entretanto, segundo Fenner (1985), dados referentes ao tamanho do banco de sementes em áreas agrícolas variam de valores próximos a zero até mais de um milhão de sementes.m⁻². Apesar do banco de sementes e da população de plantas daninhas resultantes serem compostas por muitas espécies, normalmente poucas espécies são dominantes e compreendem 70-80% do total do banco de sementes. Estas espécies dominantes são as mais nocivas, já que são resistentes as medidas de controle ou são adaptadas ao sistema de cultivo e as condições edafoclimáticas (Wilson, 1988). O banco de sementes possui fundamental importância ecológica e evolucionária na dinâmica populacional das plantas daninhas, sendo, também, um indicador da influência em longo prazo, das práticas agrônômicas aplicadas no controle destas plantas (Mayor & Dessaint, 1998).

O levantamento do banco de sementes de espécies de plantas daninhas é uma ferramenta que pode ser utilizada para a escolha de um controle mais adequado das plantas, podendo refletir em uma maior rentabilidade para o agricultor e menor impacto ambiental. O sucesso de programas de manejo integrado de plantas daninhas depende do conhecimento da biologia e dinâmica de populações das plantas daninhas e da escolha correta da tática de controle para cada problema específico (Buhler et al., 1997).

A utilização repetitiva de um mesmo herbicida ou de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação e espectro de controle de plantas daninhas por diversos anos pode selecionar espécies tolerantes, e, portanto, influenciar na

composição específica e na densidade das plantas daninhas em um determinado local. Dentro dos métodos de controle de plantas daninhas, não só o método químico atua como fator de seleção. O controle mecânico pode selecionar espécies de propagação vegetativa e o controle manual pode selecionar espécies morfológicamente semelhantes à cultura ou de difícil remoção.

Um dos herbicidas mais utilizados no Brasil e no mundo é o glyphosate, devido principalmente ao seu amplo espectro de controle de plantas daninhas e utilização de culturas transgênicas importantes como a soja e o algodão, resistentes a ação deste herbicida. Embora ainda não registrada no Brasil, o uso de culturas transgênicas resistentes ao glyphosate, têm se expandido grandemente em alguns países, como Argentina e Estados Unidos da América do Norte. A principal crítica às culturas resistentes aos herbicidas está relacionada ao aumento da pressão de seleção sobre as plantas daninhas. Haverá grande probabilidade de selecionar um biótipo de planta daninha resistente ou uma espécie tolerante ao herbicida alvo, quando estas culturas resistentes forem cultivadas em monocultura, devido ao uso repetitivo do herbicida (Kruse et al., 2000).

Embora o glyphosate seja não seletivo, espécies de plantas daninhas têm sido relatadas como tolerantes a este herbicida, como por exemplo, *Ambrosia artemisiifolia* (Kapusta et al., 1994), *Sesbania exaltata* (Raf) Rydb, *Ipomoea* spp. (L.) Jacq, (Jordan et al., 1997; Lich et al., 1997), *Apocynum cannabinum* L. e *Asclepias syriaca* L. (Wyrill & Burnside, 1976). No Brasil, algumas espécies de plantas daninhas têm mostrado tolerância ao glyphosate como *Commelina benghalensis*, *Commelina diffusa* (Durigan et al., 1988; Santos et al., 2001). Entretanto, até o momento poucos estudos têm sido feitos sobre a dinâmica populacional destas espécies.

Sendo assim, foi conduzido este experimento com o objetivo de avaliar a influência da aplicação repetitiva do glyphosate sobre a dinâmica do banco de sementes das plantas daninhas tolerantes ao glyphosate (*Commelina*

benghalensis, *Ipomoea grandifolia*, *Richardia brasiliensis*), e suscetíveis (*Amaranthus hybridus* e *Galinsoga parviflora*).

3.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido por 28 meses em área experimental do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. O delineamento experimental adotado foi de blocos casualizados, com os tratamentos em quatro repetições, em esquema fatorial 5 X 4, sendo cinco espécies de plantas daninhas e quatro doses do herbicida glyphosate. As parcelas apresentaram área útil de 2 m² e foram tratadas com brometo de metila, a fim de se esterilizar o solo, eliminando assim, o banco de semente pré-existente.

3.2.1 Semeadura das plantas daninhas

Cerca de 200 sementes por parcela das espécies de plantas daninhas *Richardia brasiliensis*, *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia*, que são naturalmente tolerantes ao herbicida glyphosate nas doses recomendadas quando adultas, e sementes das espécies daninhas *Galinsoga parviflora* e *Amaranthus hybridus*, sensíveis à ação deste herbicida, foram semeadas no dia 16/09/00. O solo da área onde foi conduzido o experimento foi classificado como Argissolo Vermelho Eutrófico, cuja análise química encontra-se na Tabela 1.

Após a germinação, as plântulas foram desbastadas para a obtenção da densidade aproximada de 100 plantas por parcela de cada espécie. A aplicação do herbicida glyphosate foi feita sobre as plantas adultas, portanto, a data de aplicação variou com a espécie estudada.

Tabela 1. Característica química do solo utilizado para a instalação do experimento

pH	Prof.	M.O	P	<u>K</u>	<u>Ca</u>	<u>Mg</u>	<u>Al</u>	<u>H+Al</u>	<u>SB</u>	<u>T</u>	V	m
CaCl ₂	cm	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	mmolc dm ⁻³						%		
5,9	0-10	38	96	7,0	67	23	0	18	97	115	84	0

Análise realizada pelo Depto. Solos e Nutrição de Plantas da USP/ESALQ

3.2.2 Tratamentos

O herbicida glyphosate foi aplicado em pré-florecimento das plantas daninhas, com pulverizador costal pressurizado com CO₂, com ponta de pulverização tipo leque de distribuição de jato elíptico de ângulo de 80 graus e volume de calda de 300 L.ha⁻¹. As doses utilizadas do herbicida glyphosate foram de 0, 0,36, 1,44 e 2,88 kg e.a.ha⁻¹. As plantas daninhas que não foram satisfatoriamente controladas foram deixadas até a produção de sementes, sendo então, incorporada toda a massa vegetal no solo. Foram feitas cinco aplicações de glyphosate em pré-florecimento sobre as plantas daninhas *A. hybridus*, *G. parviflora* e *R.brasiliensis* e quatro aplicações sobre as plantas daninhas *I. grandifolia* e *C. benghalensis*.

3.2.3 Avaliações

Inicialmente, foi avaliado o controle das plantas daninhas aos 14 dias após cada aplicação dos tratamentos (14 DAT) com glyphosate em cada parcela, usando escala de controle de 0 a 100, onde 0 representa ausência de controle e 100 controle total das plantas daninhas pelo herbicida. As parcelas de cada tratamento foram avaliadas separadamente determinando-se a emergência de plântulas em casa-de-vegetação e a separação física das sementes. Métodos estes, que estão descritos a seguir.

3.2.3.1 Coletas das amostras do solo

Após a maturação das sementes das plantas escapes, foram realizados amostragens de solo com um trado (tubo PVC adaptado) com 10 cm de diâmetro, sendo feitas coletas de 0-10 cm de profundidade do solo. Cada amostra foi composta por quatro sub amostras para se determinar a germinação direta de sementes em casa de vegetação e quatro sub amostras para a separação das sementes em laboratório. Sendo, portanto, coletadas duas amostras por parcela a cada avaliação realizada.

3.2.3.2 Quantificação do banco de sementes pela técnica de separação de sementes

O procedimento para quantificação de sementes em laboratório utilizado foi baseado nos trabalhos de Buhler & Maxwell (1993), com algumas modificações. Uma parte das amostras provenientes do campo foi homogeneizada e seca ao ar. Depois de seca, cada amostra foi peneirada (peneira de 10 mesh), retirando agregados e materiais inertes. A seguir, 150 g de amostra foram adicionadas a uma solução contendo 50 g de K_2CO_3 dissolvidos em 200 mL de água. O carbonato de potássio foi utilizado, pois aumenta a densidade da solução e separa o material orgânico da parte mineral do solo. Em seguida as amostras foram homogeneizadas por agitação manual por um minuto e posteriormente centrifugadas por 15 minutos a 10.000 g em tubos de centrifuga com capacidade de 250 mL. A centrifugação não foi realizada apenas nas amostras das parcelas com *G. parviflora*, devido à dificuldade de se identificar as sementes após este processo. Nesta espécie, as amostras de solo em solução foram colocadas em agitadores por 15 minutos, e após este período, foram mantidas em repouso até completa separação do material mineral. Os sobrenadantes foram retirados, passados por uma peneira de 50 mesh e colocados em um papel de filtro para a secagem preliminar. Depois, as sementes, juntamente com o material orgânico, foram colocadas em placas de Petri e secas em estufa a 35°C. Foi utilizado um soprador para se retirar as partículas menos densas que as sementes. Posteriormente, as

sementes de cada espécie estudada foram quantificadas, com a ajuda de uma lupa de aumento. Considerando-se que uma fatia de solo de um hectare com 10 cm de profundidade pesa em média 1.400.000 kg, o número provável de sementes/m², a 10 cm de profundidade pode ser calculado da seguinte forma:

$$\frac{\text{Sementes extraídas}}{\text{Peso da amostra (kg)}} = \frac{\text{Número provável de sementes/m}^2}{140 \text{ kg}}$$

Os resultados referentes às médias do número de sementes de cada espécie de planta daninha para cada tratamento foram submetidos a análise de variância, e as interações significativas tiveram suas médias comparadas pelo teste de Tukey (p < 0,05).

3.2.3.3 Quantificação do banco de sementes através de germinação em casa-de-vegetação

Para verificar a porcentagem de sementes que germinam prontamente no banco de sementes, parte das amostras de solo coletadas na área experimental (500 g de terra/parcela), foram colocadas separadamente em bandejas com 8 cm de profundidade em casa-de-vegetação com irrigação automática. Após cada fluxo de emergência, as plantas foram contadas e arrancadas, a seguir foi feito um revolvimento do solo para estimular novos fluxos de emergência. A quantificação das sementes foi realizada até 21 dias após a instalação. O cálculo do número de sementes não dormentes.m⁻² foi feito da seguinte maneira:

$$\frac{\text{Número de plântulas}}{\text{Peso da amostra (kg)}} = \frac{\text{Número de sementes não dormentes / m}^2}{140 \text{ kg}}$$

Os resultados referentes às médias de emergência em cada tratamento foram submetidos a análise de variância, e as interações significativas tiveram suas médias comparadas entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

3.3 Resultados e Discussão

Amaranthus hybridus

A planta daninha *A. hybridus* é uma espécie daninha sensível à ação do glyphosate. Na Tabela 2 pode-se observar o controle eficaz deste herbicida sobre as plantas adultas, principalmente nas doses de 1,44 kg e.a.ha⁻¹ e 2,88 kg e.a.ha⁻¹. A Figura 1 apresenta a quantidade de sementes desta espécie por m², em função das diferentes épocas de avaliação do banco de sementes e de doses do glyphosate. A testemunha apresentou uma produção crescente de sementes, sendo que na última avaliação foi constatada a presença de mais de 500.000 mil sementes.m⁻². De acordo, com Deuber (1992) *Amaranthus* spp, tem a capacidade de produzir até 120.000 sementes/planta. À medida que a dose de glyphosate foi aumentada o número de sementes foi decrescendo nas diferentes avaliações. A aplicação do glyphosate na dose de 2,88 kg e.a.ha⁻¹ resultou em uma diminuição no número de sementes de 43.000 (na primeira avaliação realizada) para 8.400 sementes.m⁻² (na ultima avaliação realizada). Não foram realizados testes de viabilidades com as sementes extraídas, não podendo, portanto, serem consideradas como total de sementes viáveis. A Tabela 7 refere-se ao número de sementes não dormentes de *A. hybridus*, que germinam prontamente em casa-de-vegetação, os dados mostrados foram obtidos durante a última avaliação e foram feitos até 21 dias após a colocação das bandejas em casa-de-vegetação e indicam que a testemunha apresentou o valor 1.190 sementes não dormentes.m⁻², diminuindo gradativamente com as doses aplicadas. Na maior dose do glyphosate foi encontrada 70 sementes não dormentes.m⁻². É importante lembrar que as sementes podem permanecer viáveis no solo por longos períodos sem germinar e, algumas sementes germinadas não conseguem emergir devido a condições ambientais desfavoráveis. O processo germinativo das sementes depende de fatores endógenos e exógenos como disponibilidade de água, oxigênio, temperaturas adequadas e em alguns casos, a presença de luz. Quando as sementes,

mesmo sendo viáveis não germinam, embora seja fornecida toda a condição ambiental necessária, elas são denominadas dormentes. O estado de dormência não deve ser confundido com o de quiescência, que é um estado de repouso, em que, estando a semente viável, é facilmente superado com o fornecimento das condições ambientais necessárias (Ballard et al. 1996).

Tabela 2. Porcentagem de controle visual de *A. hybridus* aos 14 DAT após 1, 2, 3, 4, e 5 aplicações de glyphosate

Tratamentos Kg e.a.ha ⁻¹	1	2	3	4	5
0	0,0 d	0,0 d	0,0 d	0,0 d	0,0 d
0,36	58,7 c	61,2 c	65,0 c	66,2 c	60,0 c
1,44	77,5 b	85,0 b	78,7 b	82,5 b	83,7 b
2,88	88,7 a	92,0 a	91,2 a	95,0 a	95,5 a
C.V	5,4	5,8	4,6	6,6	4,7
D.M.S (5%)	6,4	7,2	5,6	8,4	4,3

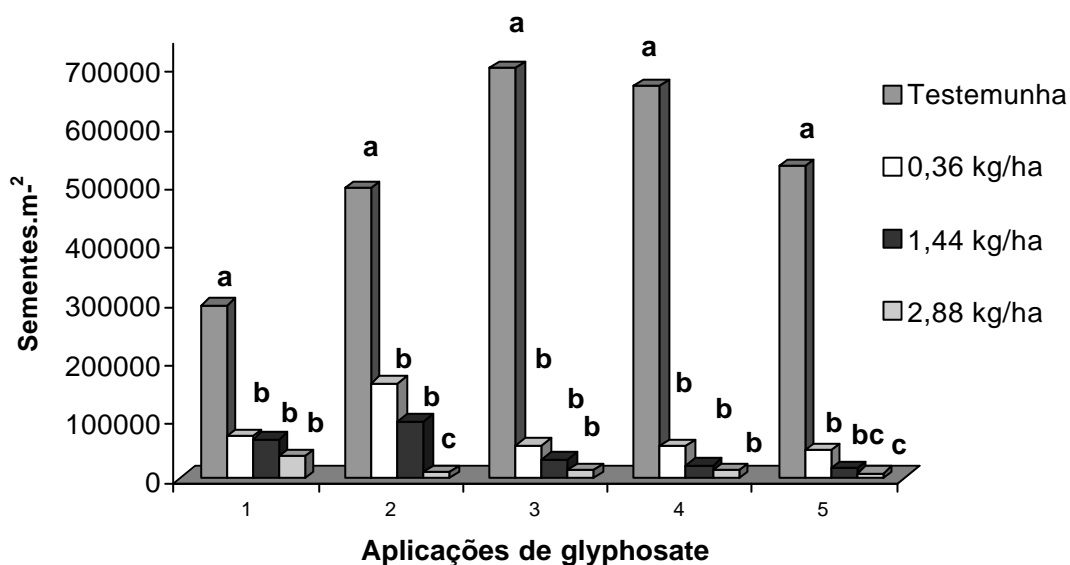


Figura 1 - Número de sementes extraídas (m²) de *A. hybridus* após as aplicações de glyphosate. As letras diferentes dentro de cada avaliação demonstram diferenças estatísticas entre as doses aplicadas do glyphosate pelo teste de Tukey (p<0,05)

Galinsoga parviflora

A planta daninha *G. parviflora*, não apresenta grande capacidade competitiva em culturas de crescimento rápido e que, portanto, tendem a cobrir o solo com sua parte aérea; e é altamente suscetível à ação do glyphosate (Kissmann & Groth, 1992). O controle no campo desta planta foi satisfatório oscilando de 80 a 95% de controle nas maiores doses aplicadas (Tabela 3). O controle satisfatório desta planta é importante, pois é uma espécie que pode desenvolver várias gerações por ano (Kissmann & Groth, 1992). Em *G. parviflora*, o número de sementes extraídas nas amostras de solo foi relativamente menor do que em *A. hybridus*, pois a capacidade de produção de semente destas duas espécies é diferente (Figura 2). *G. parviflora* apresentou alta produção de sementes na testemunha, com valores variando de 38.218 a 29.243 sementes.m⁻², na primeira e última avaliação respectivamente. Houve diferença estatística entre os tratamentos e na maior dose de glyphosate a produção diminuiu de 1.470 para 11 sementes.m⁻², ou seja, glyphosate aplicado na dosagem de 2,88 kg e.a.ha⁻¹, provocou uma diminuição da capacidade de produzir sementes desta espécie daninha em mais de 99%, se compararmos com a testemunha na última avaliação.

De acordo com a Tabela 7, *G. parviflora* apresentou na última avaliação valores que variaram de 1.400 sementes não dormentes.m⁻² na testemunha até zero sementes não dormentes.m⁻². Os dados indicam que após cinco aplicações do herbicida glyphosate na dose de 2,88 kg e.a.ha⁻¹ a planta daninha *G. parviflora* não representa mais um fator de interferência no campo, sendo suprimida por outras espécies de plantas daninhas mais tolerantes ao glyphosate.

Tabela 3. Porcentagem de controle visual de *G. parviflora* aos 14 DAT após 1, 2, 3, 4, e 5 aplicações de glyphosate

Tratamentos Kg e.a.ha ⁻¹	1	2	3	4	5
0	0,0 c	0,0 c	0,0 d	0,0 c	0,0 d
0,36	68,7 b	75,0 b	73,7 c	76,25 b	70,7 c
1,44	83,7 a	87,5 ab	86,2 b	82,5 ab	80,0 b
2,88	87,5 a	92,5 a	95,0 a	91,2 a	95,0 a
C.V	5,1	11,5	6,2	8,1	2,4
D.M.S (5%)	6,4	15,4	8,3	10,7	2,3

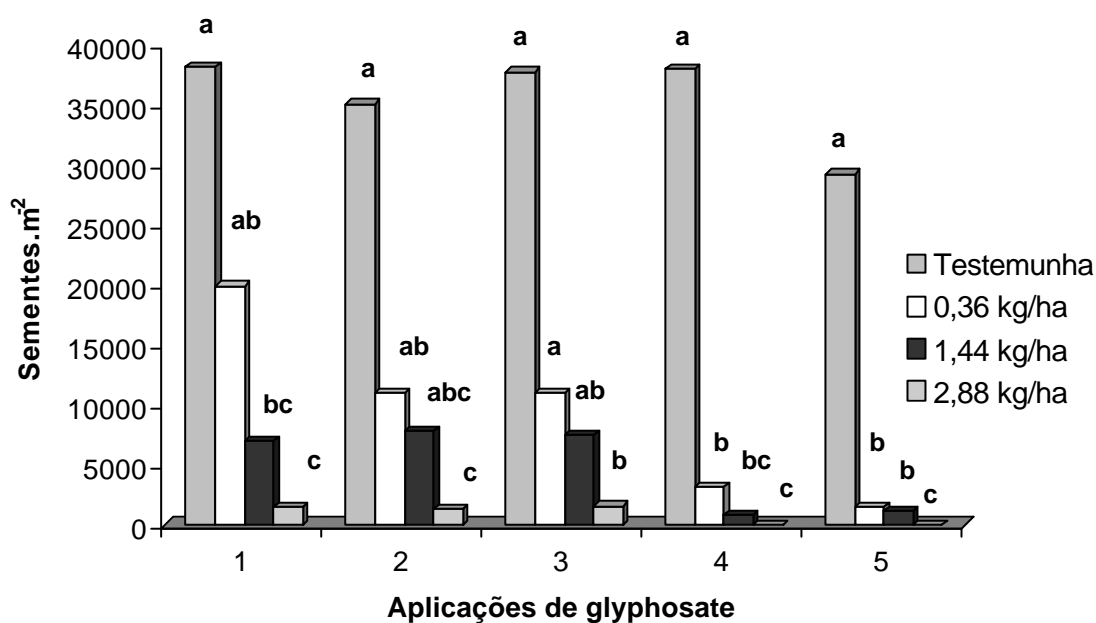


Figura 2 - Número de sementes extraídas (m²) de *G. parviflora* em diferentes aplicações do glyphosate. As letras diferentes dentro de cada avaliação demonstram diferenças estatísticas entre as doses aplicadas do glyphosate pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

As alterações na composição específica das comunidades infestantes, devido aos herbicidas, são observadas na prática quando os agricultores observam a dificuldade de controle de determinadas espécies que antes não

eram consideradas altamente nocivas no campo. Este efeito foi observado por Bezutte (1998), que concluiu que *Euphorbia heterophylla* foi selecionada pelo herbicida trifluralin aplicado isolado ou em mistura com metribuzin; *Desmodium tortuosum* foi selecionado pelo trifluralin isolado ou em mistura com imazaquin ou flumetsulan e a *Indigofera grandifolia* foi selecionada pelo trifluralin isolado e em mistura com flumetsulan após 5 anos de uso contínuo.

Ipomoea grandifolia

A planta daninha *I. grandifolia* é uma planta infestante em lavouras, especialmente em culturas anuais de verão, nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Nos ensaios de campo o controle por glyphosate foi insatisfatório, com uma porcentagem de controle visual menor que 70%, na maior dose do glyphosate aplicada (Tabela 4). Este resultado pode gerar alto acréscimo de sementes no banco de sementes do solo. Segundo Lorenzi (1994), esta é uma planta daninha capaz de produzir entre 5.000 – 6.000 sementes por planta, ocorrendo germinação até a profundidade de 10 cm no solo. Na Figura 3 pode-se observar que a quantidade de semente.m⁻² desta planta daninha foi bastante alta na testemunha alcançando valores de 19.483 a 47.041 de sementes.m⁻². A aplicação do glyphosate nas doses de 0,36 e 1,44 kg e.a.ha⁻¹ provocou um decréscimo na produção de sementes, com relação a testemunha, entretanto, a quantidade existente no banco de sementes permaneceu relativamente alta quando comparamos com as plantas suscetíveis. Na maior dose do glyphosate, a quantidade de sementes, na última avaliação, diminuiu para 5.507 sementes.m⁻². Na Tabela 7, referente ao número de sementes não dormentes, os dados obtidos durante 21 dias mostram que a testemunha apresentou 1.330 sementes não dormentes.m⁻² e a maior dose 210 sementes.m⁻², valor bem maior do que os produzidos pelas plantas susceptíveis ao glyphosate. Estas sementes poderão germinar estabelecendo uma nova planta ou podem ser predadas, parasitadas ou transportadas para outros locais ou até mesmo germinar, mas não emergir

devido a alguma condição desfavorável.

Tabela 4. Porcentagem de controle visual de *I. grandifolia* aos 14 DAT após 1, 2, 3, e 4 aplicações de glyphosate

Tratamentos Kg e.a.ha ⁻¹	1	2	3	4
0	0,0 c	0,0 c	0,0 d	0,0 d
0,36	26,2 b	31,2 b	27,5 c	35,0 c
1,44	40,0 a	36,2 b	35,0 b	47,5 b
2,88	45,0 a	52,5 a	54,0 a	65,0 a
C.V	19,4	12,2	11,9	10,3
D.M.S (5%)	10,8	7,7	7,2	5,8

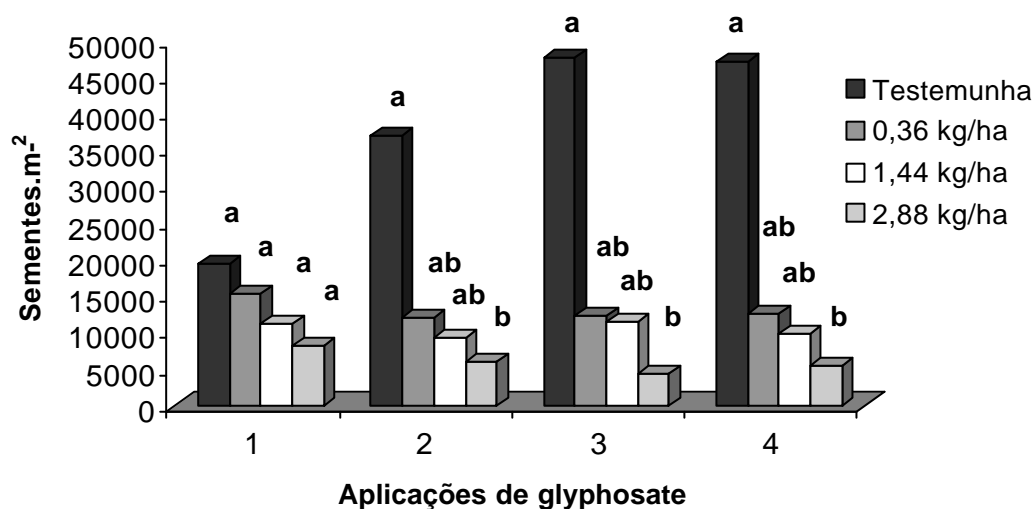


Figura 3 - Número de sementes extraídas (m²) de *I. grandifolia* em diferentes aplicações do glyphosate. As letras diferentes dentro de cada avaliação demonstram diferenças estatísticas entre as doses aplicadas do glyphosate pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Richardia brasiliensis

A planta daninha *R. brasiliensis*, é uma planta que, quando adulta, apresenta tolerância ao herbicida glyphosate (Lorenzi, 1994), o que pode ser observado na Tabela 5. Na testemunha, a produção de sementes variou de 22.866 a 220.183 sementes.m⁻², entretanto, na última avaliação feita nas parcelas onde se aplicou a maior dose do herbicida glyphosate, constatou-se 9.087 sementes.m⁻², ou seja, houve uma decréscimo em relação a testemunha de 95,8% no total das sementes extraídas (Figura 4). Com relação a sementes não dormentes (Tabela 7), a testemunha continha de 3.360 sementes.m⁻² no solo. Esta produção diminuiu com o aumento das doses, com 2,88 kg e.a.ha⁻¹ de glyphosate, constatou-se 350 sementes não dormentes.m⁻², este valor apesar de ser 10 vezes menor do que o obtido na testemunha, garante futuras infestações.

Tabela 5. Porcentagem de controle visual de *R. brasiliensis* aos 14 DAT após 1, 2, 3, 4, e 5 aplicações de glyphosate

Tratamentos Kg e.a.ha⁻¹	1	2	3	4	5
0	0,0 d	0,0 d	0,0 d	0,0 d	0,0 d
0,36	17,5 c	23,7 c	26,2 c	32,5 c	35,0 c
1,44	31,2 b	35,0 b	40,0 b	42,5 b	45,0 b
2,88	56,2 a	70,0 a	75,0 a	81,2 a	76,2 a
C.V	19,4	9,7	10,7	10,9	9,6
D.M.S (5%)	10,7	6,6	7,9	8,9	5,8

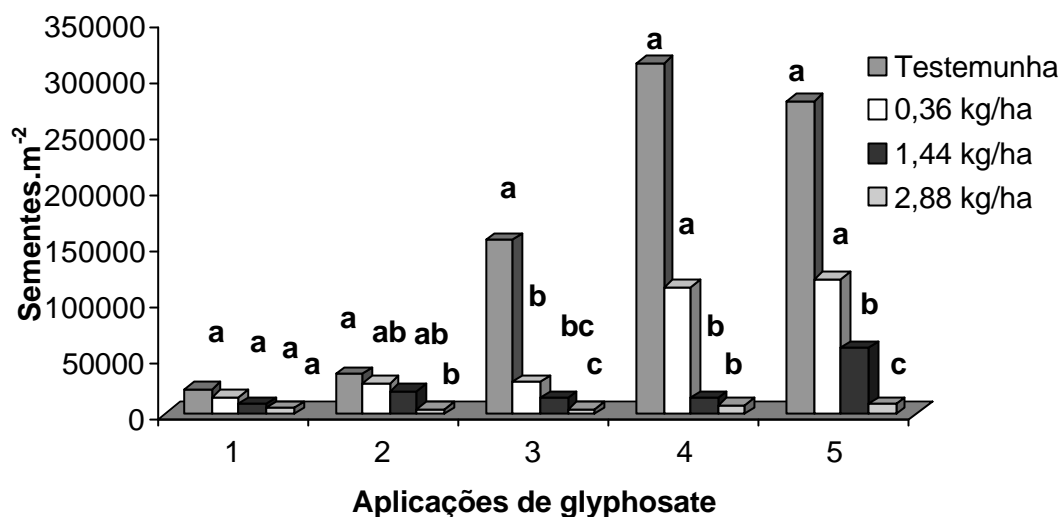


Figura 4 - Número de sementes extraídas (m^2) de *R. brasiliensis* em diferentes aplicações de glyphosate. As letras diferentes dentro de cada avaliação demonstram diferenças estatísticas entre as doses aplicadas do glyphosate pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Commelina benghalensis

A planta daninha *C. benghalensis*, é uma planta de difícil controle, principalmente na operação de dessecação para a semeadura de soja. Quando o glyphosate é aplicado sobre a planta adulta, o controle pode ser insatisfatório, uma vez que a planta é pouco suscetível (Lorenzi, 1994). Além disso, é uma planta que pode produzir dois tipos de sementes: aéreas e subterrâneas com capacidade de germinar e emergir desde cerca 12 cm de profundidade (Kissmann & Groth, 1992). No campo, a aplicação de glyphosate na maior dose resultou em um controle insatisfatório, variando de 45 a 58,7% (Tabela 6). A quantidade de sementes. m^{-2} variou de 39.390 para 53.991 sementes, ou seja, houve um aumento de sementes de um fluxo de produção para outro (Figura 3). Na Tabela 7, podemos ver que na testemunha e na maior dose do glyphosate,

o número de sementes não dormentes foi de 1.400 e 210 sementes.m⁻², respectivamente. As sementes desta espécie podem ser oriundas da parte aérea ou da subterrânea e variar em tamanho e características de germinação e emergência. Cada um desses tipos de sementes germina melhor em uma determinada profundidade, luminosidade e temperatura, o que permite a esta espécie vários fluxos de germinação durante o ano (Santos et al., 2001).

Embora as sementes produzidas pelas plantas daninhas estudadas possam ser viáveis, a germinação foi reduzida, pois a aplicação do glyphosate na fase reprodutiva das plantas pode ter afetado os níveis do ácido indol acético (AIA) nas sementes e inibir a germinação e emergência das plântulas (Issacs et al., 1989). Além disso, não se pode prever com exatidão se todas as condições providas na casa-de-vegetação foram suficientes para induzir a germinação de todas as sementes viáveis.

Tabela 6. Porcentagem de controle visual de *C. benghalensis* aos 14 DAT após 1, 2, 3, e 4 aplicações de glyphosate

Tratamentos Kg e.a.ha⁻¹	1	2	3	4
0	0,0 c	0,0 c	0,0 d	0,0 d
0,36	27,5 b	32,5 b	30,0 c	37,5 c
1,44	37,5 ab	43,7 a	41,2 b	47,5 b
2,88	46,2 a	46,7 a	47,5 a	58,7 a
C.V	18,5	12,2	9,4	6,6
D.M.S (5%)	10,8	10,8	5,8	5,0

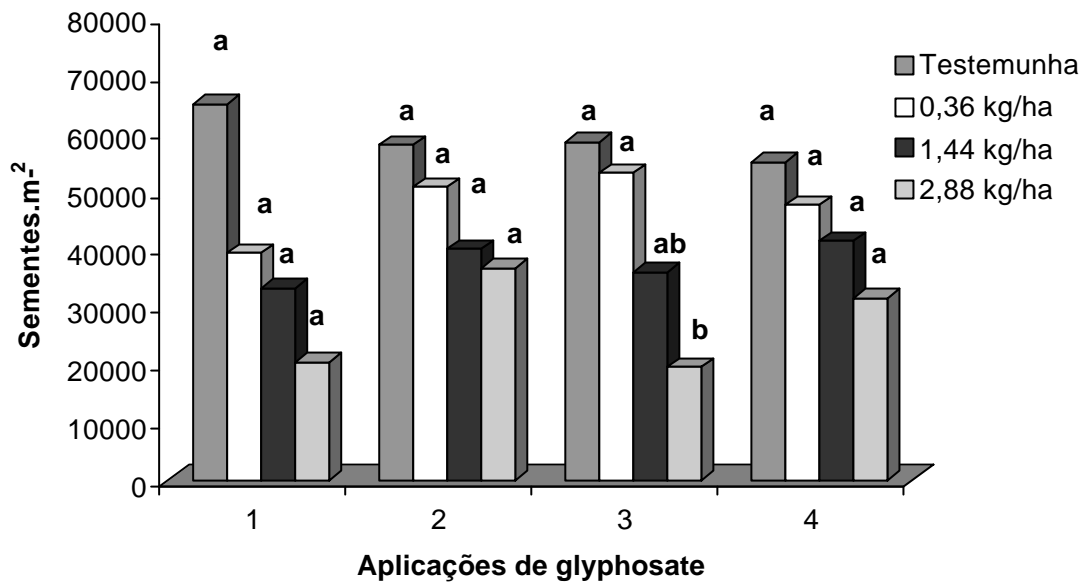


Figura 5 - Número de sementes extraídas (m^2) de *C. benghalensis* em diferentes aplicações de glyphosate. As letras diferentes dentro de cada avaliação demonstram diferenças estatísticas entre as doses aplicadas do glyphosate pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 7. Número de sementes que germinaram das amostras coletadas durante a última avaliação, nos diferentes tratamentos com glyphosate. A emergência foi avaliada até 21 dias após a colocação das amostras em casa-de-vegetação.

Tratamento	AMACH ¹	IOGR ²	GASPA ³	RCHBR ⁴	COMBE ⁵
Testemunha	1190 a	1330 a	1400 a	3335 a	1400 a
0.36 kg e.a/ha	350 b	770 b	350 b	1680 b	910 b
1.44 kg e.a/ha	140 b	280 c	70 b	770 c	420 c
2.88 kg e.a/ha	70 b	210 c	0 b	350 c	210 c
C.V.%	56,1	34,1	65,2	28,7	35,6
D.M.S (5%)	378,9	357,8	457,8	677,8	403,7

¹AMACH= *A. hybridus*; ²IOGR= *I. grandifolia*; ³GASPA= *G. parviflora*; ⁴RCHBR= *R. brasiliensis* e ⁵COMBE= *C. benghalensis*. Colunas com letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

3. 4 Conclusões

Os resultados indicam que o glyphosate reduz o número de sementes no banco de sementes, entretanto, sua aplicação repetitiva pode modificar a composição específica de plantas daninhas da área, levando a predominância de espécies tolerantes como *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Richardia brasiliensis*. Sendo assim, é importante o monitoramento das infestações de plantas daninhas nas áreas onde este herbicida é utilizado repetitivamente no manejo de plantas daninhas, para que medidas sejam adotadas no sentido de evitar a predominância de espécies tolerantes.

4 GLYPHOSATE EM MISTURA COM HERBICIDAS ALTERNATIVOS PARA O MANEJO DE PLANTAS DANINHAS TOLERANTES

Resumo

A aplicação repetitiva do herbicida glyphosate em uma área tem selecionado algumas espécies tolerantes às doses recomendadas deste herbicida. Desta forma, é importante que seja estudado a eficácia de controle destas espécies com mistura de glyphosate com herbicidas de mecanismos de ação alternativos e que apresentem efeitos sinérgicos ou aditivos. Portanto, foi instalado em condições de casa-de-vegetação, um experimento em delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por 12 tratamentos e 4 repetições, para se avaliar o efeito de misturas de glyphosate com os herbicidas seletivos chlorimuron-ethyl, sulfentrazone, carfentrazone, bentazon ou flumioxazin com glyphosate, assim como o efeito isolado destes herbicidas, sobre as plantas daninhas *Richardia brasiliensis*, *Commelina benghalensis*, *Amaranthus hybridus*, *Galinsoga parviflora* e *Ipomoea grandifolia*. As interações foram aditivas para as plantas daninhas *I. grandifolia* e *C. benghalensis*; sendo que, os herbicidas flumioxazin, sulfentrazone e carfentrazone aplicados isoladamente e em mistura com glyphosate foram os que proporcionaram os melhores níveis de controle.

A interação de glyphosate com sulfentrazone aos 14 DAT foi antagônica em *R. brasiliensis*, já a mistura com os demais herbicidas estudados foi aditiva, sendo que os tratamentos com mistura de glyphosate e chlorimuron-ethyl ou flumioxazin, foram mais eficazes. Em *Amaranthus hybridus*, os tratamentos que apresentaram melhores níveis de controle, foram o glyphosate e carfentrazone, aplicados isoladamente e a mistura de glyphosate com flumioxazin, sulfentrazone, chlorimuron-ethyl e bentazon, sendo estas interações aditivas. No caso de *Galinsoga parviflora*, os tratamentos isolados flumioxazin e sulfentrazone apresentaram controle total, o mesmo aconteceu com as misturas de glyphosate com carfentrazone, flumioxazin, sulfentrazone e chlorimuron-ethyl. Nesta espécie, a interação de glyphosate com bentazon se mostrou antagônica.

GLYPHOSATE IN MIXTURES WITH ALTERNATIVE HERBICIDES IN THE MANAGEMENT OF TOLERANT WEED SPECIES

Summary

The repetitive use of glyphosate in an area as a non-selective herbicide for vegetation management has selected some hard to kill weed species. Therefore, it is important to study the synergistic or antagonistic or additive effects of tank mixtures of glyphosate with alternative herbicides. It was developed in greenhouse conditions an experiment in randomized completely design, 12 treatments and four replications, in order to evaluate the efficacy of the herbicides chlorimuron-ethyl, carfentrazone, bentazon, sulfentrazone, or flumioxazin with the weeds *Richardia brasiliensis*, *Commelina benghalensis*,

Amaranthus hybridus, *Galinsoga parviflora* and *Ipomoea grandifolia*. The results showed that the interactions were additives on the weed *I. grandifolia* and *Commelina benghalensis* however, for the herbicides flumioxazin, sulfentrazone and carfentrazone sprayed alone and in mixture with glyphosate gave better weed control results. The interaction of glyphosate with sulfentrazone was antagonic in *R. brasiliensis*, and the mixture of glyphosate with the other herbicides studied in this research was additive; however, the treatments in mixture with glyphosate and chlorimuron-ethyl or flumioxazin, were more efficient in the weed control. In *Amaranthus hybridus*, the best control results were obtained with glyphosate or carfentrazone alone and the mixture of glyphosate with flumioxazin, sulfentrazone, chlorimuron-ethyl and bentazon, and these interactions were additives. In the case of *Galinsoga parviflora*, flumioxazin, sulfentrazone, chlorimuron-ethyl with glyphosate and flumioxazin and sulfentrazone alone the control was 100%. In this weed, the interaction of glyphosate with bentazon was antagonic.

4.1 Introdução

A aplicação por vários anos de um mesmo herbicida pode levar a seleção de algumas espécies de plantas daninhas, aumentando sensivelmente a sua importância relativa na área. O herbicida glyphosate, por exemplo, aplicado isoladamente nas doses recomendadas, pode proporcionar a seleção de algumas plantas daninhas como *Commelina benghalensis*, *Commelina virginica*, *Ipomoea grandifolia*, entre outras, devido à tolerância destas plantas, e à eficiente eliminação das demais espécies suscetíveis da comunidade infestante. Uma das formas de prevenir a seleção de plantas daninhas tolerantes ou resistentes, é o uso de misturas de herbicidas com diferentes

ingredientes ativos e que principalmente apresentem mecanismos de ação distintos (Powles & Holtum, 1994).

A performance da mistura de herbicidas pode ser sinérgica, antagônica ou aditiva, quando comparada com a somatória das aplicações individuais de cada produto componente da mistura. Sinérgico ocorre quando o efeito observado da mistura é maior do que a resposta predita por um modelo estatístico apropriado, que considera o efeito dos produtos aplicados isoladamente. Antagonismo ocorre quando a aplicação conjunta dos herbicidas resulta em um controle menor do que o controle esperado pelo modelo. A interação aditiva ocorre quando o controle da planta daninha pela mistura é equivalente ao controle esperado (Starke & Oliver, 1998). De um ponto de vista prático, antagonismo é a única resposta realmente indesejada devido à diminuição da eficácia no controle das plantas daninhas. Quando dois produtos possuem uma interação aditiva, o nível de controle é igual à resposta esperada quando cada herbicida é aplicado isoladamente. Sinérgico é a interação desejada, pois aumenta o de controle das plantas daninhas esperado.

As misturas em tanque de glyphosate com herbicidas do grupo químico dos difeniléteres, como lactofen e oxyfluorfen (em doses subletais), proporcionaram resultados sinérgicos no controle das plantas daninhas *Malva parviflora* L. (Wells & Appleby, 1992) e *Cyperus esculentus* L. (Pereira & Crabtree, 1986), respectivamente. Os herbicidas lactofen e oxyfluorfen causaram rupturas na membrana plasmática aumentando a absorção do ¹⁴C-glyphosate o que levou a um maior acúmulo de shiquimato.

De acordo com Lich et al. (1997) a mistura de glyphosate com os herbicidas bentazon ou fomiclorac resultou em respostas aditivas no controle de *Abutilon theophrasti* L.. As interações antagônicas são observadas mais freqüentemente quando se usam os herbicidas chlorimuron-ethyl, imazethapyr ou thifensulfuron em mistura com glyphosate.

Os objetivos deste trabalho foram: (i) determinar o tipo de interação do herbicida glyphosate quando em mistura com lactofen, sulfentrazone,

chlorimuron-ethyl, imazethapyr, flumioxazin e carfentrazone, sobre as plantas daninhas *Ipomoea grandifolia*, *Commelina benghalensis*, *Amaranthus hybridus*, *Galinsoga parviflora* e *Richardia brasiliensis*.

4.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido em condições de casa-de-vegetação no Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba - SP, Brasil.

As sementes das plantas daninhas *Ipomoea grandifolia*, *Commelina benghalensis*, *Amaranthus hybridus*, *Galinsoga parviflora* e *Richardia brasiliensis*, foram semeadas em vasos com capacidade de 300 mL, utilizando como substrato uma mistura de terra e matéria orgânica (3:1). A caracterização química do substrato no qual as plantas germinaram e se desenvolveram pode ser vista na Tabela 1. A irrigação foi feita mantendo-se a umidade próxima a capacidade de campo. Após a emergência, as plântulas foram desbastadas para a obtenção de quatro plantas uniformes por vaso.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, constituído de 12 tratamentos e quatro repetições. As aplicações foram feitas quando as plantas daninhas apresentaram o segundo par de folhas verdadeiras. Para a aplicação dos herbicidas foi utilizada uma câmara de aplicação experimental de herbicidas para vasos, acionada por um motor elétrico, com uma ponta de pulverização montada em bico leque modelo TeeJet 8003E, pulverizando em média à 50 cm da superfície do alvo, volume de calda de 200 L.ha⁻¹. Os tratamentos utilizados foram: glyphosate (0,42 kg e.a.ha⁻¹), sulfentrazone (0,70 kg i.a.ha⁻¹), chlorimuron-ethyl (0,15 kg i.a.ha⁻¹), carfentrazone (0,03 kg i.a.ha⁻¹), bentazon (0,72 kg i.a.ha⁻¹), flumioxazin (0,05 kg i.a. ha⁻¹) e a mistura de glyphosate com estes herbicidas na mesmas doses

descritas. Foi adicionado surfactante não iônico a 0,25 % v/v, quando necessário.

Tabela 1. Característica química do substrato utilizado para a instalação do experimento

pH	M.O	P	<u>K</u>	<u>Ca</u>	<u>Mg</u>	<u>Al</u>	<u>SB</u>	<u>T</u>	V	m
CaCl_2	g dm^{-3}	mg dm^{-3}	mmolc dm^{-3}						%	
6,2	27	327	13,9	42	27	0	92,9	97,9	85	0

Análise realizada pelo Depto. Solos e Nutrição de Plantas da USP/ESALQ.

As plantas daninhas foram avaliadas aos 7 e 14 dias após a aplicação dos tratamentos, usando uma escala de 0%, representando efeito nulo dos herbicidas sobre as plantas, a 100%, que representa a morte total das plantas. Os dados obtidos nas avaliações foram analisados de acordo com o modelo proposto por Colby (1967). A equação usada para o cálculo da resposta esperada na interação do glyphosate com outros herbicidas foi:

$$E = 100 - \frac{(100 - X) \times (100 - Y)}{100}$$

Onde E é a redução de crescimento esperado ou porcentagem de controle esperada pela mistura de herbicidas, X e Y representam a porcentagem de controle dos herbicidas aplicados isoladamente. A biomassa verde das plantas daninhas foi avaliada duas semanas após os tratamentos. A redução do peso (Rd) foi calculada através da equação:

$$Rd = 100 - \frac{\text{Biomassa verde da planta tratada}}{\text{Biomassa da testemunha}} \times 100$$

Os valores calculados foram comparados com os valores observados através do teste de Fisher, de aplicação fácil quando as frequências são baixas, com diferença mínima significativa avaliada, ao nível $p < 0,05$.

4.3 Resultados e Discussão

Ipomoea grandifolia

De acordo com a Tabela 2, pode-se observar que a planta daninha *Ipomoea grandifolia*, foi controlada de maneira eficiente aos 14 dias após os tratamentos (DAT), pelos herbicidas glyphosate (94%), carfentrazone (97%), sulfentrazone (99%) e flumioxazin (91%), aplicados isoladamente. Com relação à interação de glyphosate com carfentrazone, flumioxazin, bentazon, sulfentrazone e chlorimuron-ethyl, os resultados foram aditivos, ou seja, não houve diferenças significativas entre o controle obtido em casa-de-vegetação e o controle esperado através da equação de Colby (1967). Resultados semelhantes foram obtidos com a interação de glyphosate com chlorimuron-ethyl, imazethapyr, ou thifensulfuron mais nitrato de amônio sobre as plantas daninhas *Ipomoea hederaceae* e *Chenopodium album* (Lich et al., 1997). Estes mesmos pesquisadores constataram efeito sinérgico na mistura de glyphosate (420 g e.a.ha⁻¹) com o herbicida bentazon (560 g i.a.ha⁻¹) no controle de *Chenopodium album* L.

Na Tabela 2 pode-se observar, também, que os tratamentos que proporcionaram maior redução da biomassa verde, são: lactofen e sulfentrazone aplicados isoladamente (73,9%) e a mistura de glyphosate com

sulfentrazone (76,0%). Estes herbicidas são recomendados em condições de pós-emergência inicial desta planta daninha.

Tabela 2. Controle das plantas daninhas, avaliado visualmente, observado e esperado (Colby) aos 7 e 14 DAT e % de redução da biomassa (% Rd) aos 14 DAT de *Ipomoea grandifolia*

Tratamentos	7 DAT	Colby	14 DAT	Colby	% Rd	Colby
1- glyphosate	77,5		94,0		98,7	
2- carfentrazone	100,0		97,0		93,0	
3- flumioxazin	93,0		91,0		87,0	
4- sulfentrazone	97,0		99,0		89,0	
5- chlorimuron-ethyl	69,0		72,0		82,0	
6- bentazon	81,0		76,0		89,0	
7- gly + carfentrazone	100,0	100,0	100,0	99	95,0	99,0
8- gly + flumioxazin	100,0	98,0	100,0	99,0	99,0	99,8
9- gly + sulfentrazone	100,0	99,0	100,0	100,0	99,0	99,8
10- gly + chlorimuron	97,0	93,0	97,0	98,0	98,0	99,7
11- gly + bentazon	81,0	95,0	94,0	98,0	97,0	99,8
12- testemunha	0,0		0,0		0,0	
D.M.S _{0,05}		11,0		9,5		5,0

Richardia brasiliensis

O herbicida glyphosate, quando aplicado isoladamente, controlou a planta daninha *Richardia brasiliensis* em 60,0% aos 7 DAT e 90% aos 14 DAT (Tabela 3), indicando a suscetibilidade desta espécie, quando o herbicida é aplicado em condições de pós-emergência inicial da planta daninha, entretanto, não recomendado a aplicação deste herbicidas sobre as plantas adultas destas espécie.

Os herbicidas chlorimuron-ethyl e sulfentrazone, aplicados isoladamente, não controlaram satisfatoriamente estas plantas. De acordo com Rodrigues & Almeida (1998), *R. brasiliensis*, é uma espécie mediantemente suscetível à estes herbicidas.

Tabela 3. Controle das plantas daninhas, avaliado visualmente, observado e esperado (Colby) aos 7 e 14 DAT % de redução da biomassa (% Rd) aos 14 DAT de *R. brasiliensis*

Tratamentos	7 DAT	Colby	14 DAT	Colby	% Rd	Colby
1- glyphosate	60,0		90,0		83,0	
2- carfentrazone	80,0		95,0		89,0	
3- flumioxazin	95,0		100,0		94,0	
4- sulfentrazone	40,0		30,0		36,0	
5- chlorimuron-ethyl	40,0		55,0		56,0	
6- bentazon	80,0		95,0		91,0	
7- gly + carfentrazone	90,0	92,0	95,0	99,0	94,0	98,1
8- gly + flumioxazin	100,0	98,0	100,0	100,0	96,0	99,3
9- gly + sulfentrazone	82,0	76,0	67,0	96,0	60,0	89,1
10- gly + chlorimuron	80,0	76,0	90,0	95,0	84,0	92,5
11- gly + bentazon	100,0	92,0	100,0	99,0	96,0	98,4
12- testemunha	0,0	0,0	0,0		0,0	
D.M.S _{0,05}		21,0		22,0		18,0

A interação do glyphosate, 14 DAT, com os herbicidas carfentrazone, bentazon, chlorimuron-ethyl ou flumioxazin, foi aditiva, não havendo, portanto, diferenças do controle obtido com o controle esperado, calculado através da equação de Colby (1967). Por sua vez, a interação de glyphosate com sulfentrazone nesta avaliação, foi antagônica, já que a diferença entre o controle obtido e esperado foi maior que a D.M.S _{0,05%}. Este tipo de interação, também foi observado por Starke & Oliver (1998) com as plantas *Amaranthus palmeri*, *Echinochloa crus-galli* (L) Beauv e *Ipomoea lacunosa* L.

O antagonismo do glyphosate por herbicidas de contato tem sido previamente reportado (Appely & Somabhi, 1978; Hydrick & Shaw, 1994; Lich et al., 1997; Selleck & Baird, 1981). Estes pesquisadores sugerem que o glyphosate não deve ser aplicado em combinações com fomesafen ou sulfentrazone no controle em pós-emergência das plantas daninhas na cultura da soja. Com relação, a porcentagem de redução da biomassa verde, carfentrazone ou flumioxazin em mistura com glyphosate ou isolados, proporcionaram melhor controle.

Commelina benghalensis

De acordo com a Tabela 4 pode-se observar que os herbicidas, carfentrazone, sulfentrazone, e flumioxazin, apresentaram excelente controle sobre esta espécie de planta daninha, quando aplicados em pós-emergência inicial. No caso dos herbicidas chlorimuron-ethyl, bentazon o controle foi apenas satisfatório (>80%). A interação de glyphosate com todos os herbicidas utilizados mostrou-se aditiva. Resultados semelhantes foram obtidos por Starke & Oliver (1998), que demonstraram que a aplicação de glyphosate com chlorimuron-ethyl ou com imazethapyr, sobre as plantas daninhas *Amaranthus palmeri*, *I. lacunosa*, *I. hederaceae* e *E. crus-galli*, foi aditiva ou sinérgica. Estes mesmos autores observaram em condições laboratoriais que o glyphosate aumentou a absorção de ^{14}C -chlorimuron-ethyl e ^{14}C -imazethapyr em *A. palmeri* e *Abutilon theophrasti*, isto provavelmente tenha ocorrido, devido ao surfactante presente na formulação do glyphosate.

Com relação a porcentagem de redução de biomassa, todas as misturas do glyphosate com os herbicidas alternativos reduziram a biomassa em mais de 90%, com relação aos tratamentos que envolveram apenas um herbicida os mais eficazes foram: sulfentrazone (99%), flumioxazin (98%), chlorimuron-ethyl (92%) e carfentrazone (77%), o tratamento que apresentou menor redução foi com o herbicida glyphosate sozinho (71%). Todos estes herbicidas, de acordo

com Rodrigues & Almeida (1998), são recomendados no controle desta espécie daninha, com aplicação em pós-emergência.

Tabela 4. Controle das plantas daninhas, avaliado visualmente, observado e esperado (Colby) aos 7 e 14 DAT e % de redução da biomassa (% Rd) 14 DAT de *C. benghalensis*

Tratamentos	7 DAT	Colby	14 DAT	Colby	% Rd	Colby
1- glyphosate	32,5		77,0		71,0	
2- carfentrazone	100,0		97,0		77,0	
3- flumioxazin	100,0		100,0		98,0	
4- sulfentrazone	100,0		100,0		99,0	
5- chlorimuron-ethyl	83,0		84,0		92,0	
6- bentazon	73,0		84,0		73,0	
7- gly + carfentrazone	100,0	100,0	100,0	99,0	99,0	93,3
8- gly + flumioxazin	100,0	100,0	100,0	100,0	99,0	99,4
9- gly + sulfentrazone	100,0	100,0	100,0	100,0	99,0	99,7
10- gly + chlorimuron	80,0	88,0	97,0	96,0	98,5,0	97,6
11- gly + bentazon	91,0	81,0	99,0	96,0	95,0	92,1
12- testemunha	0,0		0,0		0,0	
D.M.S _{0,05}		20,0		8,3		10,0

Amaranthus hybridus

Observando a Tabela 5, pode-se observar que aos 14 DAT, todos os herbicidas utilizados apresentaram um controle satisfatório (> 80%), entretanto, os tratamentos que utilizaram glyphosate, sulfentrazone e flumioxazin, foram os mais eficazes. Com relação a mistura de glyphosate com herbicidas alternativos, todos os tratamentos resultaram em uma interação aditiva, ou seja, o controle obtido foi similar ao controle predito pela equação de Colby, obtendo-se um controle total desta espécie de planta daninha que é suscetível a todos os herbicidas utilizados. Todas as misturas proporcionaram uma redução de

biomassa verde próximo de 99%, um resultado positivo no controle desta espécie.

Tabela 5. Controle das plantas daninhas, avaliado visualmente, observado e esperado (Colby) aos 7 e 14 DAT e % de redução da biomassa (% Rd) aos 14 DAT de *Amaranthus hybridus*

Tratamentos	7 DAT	Colby	14 DAT	Colby	% Rd	Colby
1- glyphosate	99,0		100,0		95,4	
2- carfentrazone	93,0		92,0		93,0	
3- flumioxazin	100,0		100,0		98,0	
4- sulfentrazone	100,0		97,0		98,0	
5- chlorimuron-ethyl	84,0		90,0		88,4	
6- bentazon	70,0		85,0		81,2	
7- gly + carfentrazone	100,0	99,0	95,0		99,1	
8- gly + flumioxazin	100,0	100,0	100,0	100,0	99,3	99,7
9- gly + sulfentrazone	100,0	100,0	100,0	100,0	99,3	99,9
10- gly + chlorimuron-	100,0	99,0	100,0	100,0	99,3	99,9
11- gly + bentazon	97,0	99,0	100,0	100,0	99,3	99,4
12- testemunha	0,0		0,0		0,0	99,1
D.M.S _{0,05}		9,3		5,0		5,1

Galinsoga parviflora

De acordo com a Tabela 6, os tratamentos envolvendo os herbicidas flumioxazin e sulfentrazone obtiveram o controle total desta planta daninha aos 14 DAT, os demais herbicidas apresentaram um controle maior que 80%. O herbicida chlorimuron-ethyl, que aos 7 DAT obteve um controle insatisfatório desta planta daninha, aumentou a fitotoxicidade alcançando o controle de 85%. No caso das misturas, o resultado da interação de glyphosate com carfentrazone, flumioxazin, sulfentrazone e chlorimuron-ethyl foi aditiva, não havendo diferença estatística do controle obtido e predito por Colby. No caso do

bentazon a interação foi antagônica aos 14 DAT, ou seja, há interferência de um herbicida sobre o efeito do outro, podendo ocasionar um menor efeito inibitório dos herbicidas.

Tabela 6. Controle das plantas daninhas, avaliado visualmente, observado e esperado (Colby) aos 7 e 14 DAT e % de redução da biomassa (% Rd) aos 14 DAT de *Galinsoga parviflora*

Tratamentos	7 DAT	Colby	14 DAT	Colby	% Rd	Colby
1- glyphosate	86,0		96,0		95,2	
2- carfentrazone	98,0		96,0		95,2	
3- flumioxazin	100,0		100,0		95,2	
4- sulfentrazone	98,0		100,0		88,0	
5- chlorimuron-ethyl	69,0		85,0		43,0	
6- bentazon	96,0		95,0		59,0	
7- gly + carfentrazone	100,0	99,0	100,0	99,0	94,0	99,7
8- gly + flumioxazin	100,0	100,0	100,0	100,0	95,0	99,7
9- gly + sulfentrazone	100,0	99,0	100,0	100,0	95,0	99,4
10- gly + chlorimuron	100,0	95,0	100,0	99,0	83,0	97,2
11- gly + bentazon	90,0	99,0	90,0	99,0	82,0	98,0
12- testemunha	0,0	0,0	0,0		0,0	
D.M.S _{0,05}		9,7		4,0		17,0

Os tratamentos que proporcionaram maior redução de biomassa verde foram: glyphosate, carfentrazone, flumioxazin, glyphosate + flumioxazin e glyphosate + sulfentrazone, com cerca de 95% de redução. Todos estes herbicidas são indicados no controle desta espécie de planta daninha em pós-inicial. Os herbicidas chlorimuron-ethyl e bentazon aplicados isoladamente, ocasionaram menor redução de biomassa, segundo Lorenzi (1994), esta espécie é mediamente suscetível a estes herbicidas.

4.4 Conclusões

- a) A aplicação do herbicida glyphosate em mistura com herbicidas que apresentam mecanismos de ação diferenciados da inibição da EPSPs pode resultar em efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos; sendo que, o tipo de efeito é dependente da planta daninha a ser controlada e do herbicida em mistura com o glyphosate.
- b) No controle de *G. parviflora* a mistura de glyphosate com bentazon resulta em uma interação antagônica e carfentrazone, flumioxazin, sulfentrazone e chlorimuron-ethyl em interação aditiva.
- c) Em *R. brasiliensis*, a interação de glyphosate com sulfentrazone é antagônica, e com carfentrazone, flumioxazin, sulfentrazone e chlorimuron-ethyl há uma interação aditiva.
- d) Em *C. benghalensis*, o herbicida glyphosate em mistura com herbicidas alternativos estudados resultou em interação aditiva, o mesmo ocorrendo no controle de *A. hybridus* e *I. grandifolia*.
- e) Os herbicidas bentazon e sulfentrazone não devem ser utilizados em misturas de tanque com o herbicida glyphosate, eles podem apresentar efeitos antagonísticos em algumas espécies de plantas daninhas na eficácia de controle de plantas daninhas.

5 ABSORÇÃO, TRANSLOCAÇÃO E METABOLISMO DO GLYPHOSATE POR PLANTAS TOLERANTES E SUSCETÍVEIS A ESTE HERBICIDA.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a absorção foliar, translocação e metabolismo do ^{14}C -glyphosate pelas plantas daninhas *Commelina benghalensis* L., *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Don. e *Amaranthus hybridus* L. e absorção foliar e translocação pelas plantas de soja (*Glycine max* (L) Merrill) resistente (R) e suscetível (S) a este herbicida. O glyphosate foi aplicado através de 4 gotas de 0,5 μL de uma solução contendo o produto comercial, na dose de campo de 720 g e.a.ha $^{-1}$ em mistura com ^{14}C -glyphosate, na face adaxial da segunda folha verdadeira das plantas estudadas. As avaliações foram feitas a 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após o tratamento com o herbicida (HAT) para os estudos de absorção e translocação e 72 HAT para os estudos de metabolismo. Os resultados de absorção e translocação demonstraram que mais de 90% do glyphosate aplicado foi absorvido por *A. hybridus* e *G. max* R e S até 72 HAT. A maior parte do herbicida permaneceu na folha tratada, com uma taxa de translocação ao redor de 25% do glyphosate aplicado. Em *I. grandifolia*, 80% do herbicida foi absorvido até 72 HAT, entretanto, houve uma menor translocação, somente 2,2; 3,5 e 4,6% de ^{14}C glyphosate absorvido estava presente na parte aérea, caule e raiz. *C. benghalensis* apresentou uma taxa de absorção de 66% até 72 HAT, sendo,

portanto, a penetração diferencial do herbicida glyphosate um provável mecanismo de tolerância desta planta daninha. Nesta avaliação, 39% do glyphosate estava presente na folha tratada e 15,2 e 11,6% na parte aérea e raiz, respectivamente. Nos estudos de metabolismo, foi detectado o metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA) apenas em *C. benghalensis*, sendo, portanto, o metabolismo diferencial um possível mecanismo de tolerância desta planta daninha. Os resultados obtidos nesta pesquisa permitem concluir que o principal mecanismo de tolerância de *C. benghalensis* ao glyphosate é devido a absorção diferencial e metabolismo do herbicida pela planta daninha. Em *I. grandifolia* a tolerância ocorre devido a uma menor translocação do herbicida, não havendo evidências de metabolismo diferencial do herbicida por esta planta daninha.

ABSORPTION, TRANSLOCATION AND METABOLISM OF GLYPHOSATE BY TOLERANT AND SUSCEPTIBLE PLANTAS TO THIS HERBICIDE

Summary

The objective of this research was to characterize the foliar absorption, translocation and metabolism of ^{14}C -glyphosate by the weeds *Commelina benghalensis* L., *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Don., and *Amaranthus hybridus* L., and foliar absorption and translocation of resistant (R) and susceptible (S) soybean plants (*Glycine max* (L) Merril) to this herbicide. The glyphosate was applied through four drops of 0.5 μL of a solution contents commercial product, at the recommended dose of 720 g a.e.ha $^{-1}$ in mixture with ^{14}C -glyphosate, on the adaxial surface of the second true leaf of the studied plants. The evaluations were done at 2, 4, 8, 12, 24, 48 and 72 hours after

herbicide treatment (HAT) for the experiments of absorption and translocation and, 72 HAT for the experiments of metabolism. The results of absorption and translocation showed that *A. hybridus* and *G. max* R and S absorbed more than 90% of the glyphosate applied after 72 HAT. The major part of the herbicide remained in the treated leaf, with a glyphosate translocation rate of 25%. In *I. grandifolia*, 80% of the herbicide was absorbed after 72 HAT, however, there was a lower translocation, and only 2.2; 3.5 and 4.6% of the ¹⁴C-glyphosate were present in the shoot, branch and root, respectively. *C. benghalensis* presented an absorption rate of 66% after 72 HAT, so the differential glyphosate penetration was the mechanism responsible for tolerance of this weed. In this evaluation, 39% of the glyphosate was present in the treated leaf and 15.2 and 11.6% in the shoot and root, respectively. In the studies of metabolism, it was detected the metabolite aminomethylphosphonic acid (AMPA) only in *C. benghalensis*, being the differential metabolism the mechanism of tolerance of this weed. The overall conclusion of this research is that the glyphosate tolerance of *C. benghalensis* is due to the differential absorption and translocation of the herbicide by the weed. In *I. grandifolia* the tolerance occurs due to lower translocation of the herbicide, and there is no data evidence that differential metabolism of the herbicide occurs in this weed.

5.1 Introdução

O glyphosate é um herbicida aplicado em condições de pós-emergência das plantas, cuja eficácia é dependente de processos como a retenção do herbicida na superfície foliar, a penetração foliar, translocação na planta até o sítio de ação e a inibição da enzima alvo do herbicida a enolpiruvilshiquimato-P-sintetase (EPSPs) (Kirkwood & McKay 1994).

A absorção do glyphosate é um processo bifásico que envolve uma rápida penetração inicial através da cutícula, seguido por uma absorção

simplástica lenta. A duração deste processo é dependente de vários fatores, como a espécie e a idade da planta, condições ambientais, concentração do herbicida na calda e do surfactante. Uma vez que o glyphosate penetra na planta através da cutícula e membrana plasmática dos tecidos fotossintetizantes, é necessário que ocorra a translocação simpástica através de tecidos vasculares, para os sítios alvos do herbicida (Satichivi et al., 2000). O movimento do glyphosate pelo floema segue a mesma rota dos produtos da fotossíntese (açúcares), ocorrendo das folhas fotossinteticamente ativas, em direção às partes das plantas que utilizam estes açúcares para crescimento, manutenção, metabolismo, ou armazenamento para uso futuro, como por exemplo, raízes, tubérculos, rizomas, folhas jovens e zonas meristemáticas. A quantidade de açúcar translocada para cada uma destas partes muda durante o ciclo de vida da planta e conseqüentemente influencia o movimento do herbicida. Portanto, condições que favoreçam a fotossíntese auxiliam também a translocação do glyphosate (Dellacioppa, et al., 1986). A translocação representa um processo essencial para a boa eficácia do herbicida (Wanamarta & Penner, 1989). Da mesma forma, a absorção e o metabolismo também podem afetar a susceptibilidade de uma planta ao glyphosate.

De modo geral, o metabolismo dos herbicidas nas plantas ocorre em quatro fases (Colen, 1994). A fase I (transformação) é caracterizada pela alteração na estrutura química do herbicida, causada por reações de oxidação, redução e hidrólise. Na fase II (conjugação) muitos herbicidas são rapidamente conjugados à açúcar por ponte glicosídica. Esse processo é catalizado pela glicosiltransferase. Os herbicidas podem ser também conjugados a glutatona pela glutatona-S-transferase, resultando assim, em conjugados menos fitotóxicos e mais solúveis em água. Na fase III (compartimentalização) ocorre o transporte do herbicida para dentro do vacúolo ou matriz extracelular, e na fase IV há o processamento completo destes compostos. Nos solos e nas plantas o principal metabólito do glyphosate é o ácido aminometilfosfônico (AMPA),

detectado em algumas plantas naturalmente tolerantes a este herbicida, como *Agropyron repens* e *Equisetum arvense* (Coupland, 1985; Dyer, 1994).

A maioria dos casos observados de tolerância de plantas ao glyphosate não teve seus mecanismos de tolerância elucidados. O entendimento dos mecanismos de tolerância ao glyphosate é fundamental para que alternativas de manejo sejam planejadas ou para melhorar a eficácia do produto estudado. O objetivo deste experimento foi elucidar os mecanismos principais de tolerância de plantas ao herbicida glyphosate, através da análise da absorção, translocação e metabolismo diferencial do herbicida nas plantas daninhas *C. benghalensis*, *I. grandifolia* e *A. hybridus* e absorção e translocação em plantas de soja (*G. max*) resistente e suscetível a este herbicida.

5.2 Material e Métodos

Os estudos dos mecanismos de tolerância de plantas ao glyphosate foram conduzidos nos laboratórios e instalações do Departamento de Química Agrícola y Edafologia, da Universidad de Córdoba, campus de Rabanales, Espanha, sob a orientação do Prof. Dr. Rafael de Prado Amián.

5.2.1 Preparo da solução de glyphosate radiomarcado

Glyphosate marcado com carbono 14 (^{14}C) no radical phosphonomethylene (C3), apresentando atividade específica de 200 GBq/mmol e 98% de pureza foi empregado nos experimentos de absorção translocação e metabolismo. Nos estudos de absorção e translocação foi preparado uma solução com volume de 100 μL , contendo 163,5 KBq e para os estudos de metabolismo foi preparada uma solução de 250 KBq. Estas soluções foram preparadas através da diluição do glyphosate marcado em uma calda contendo o glyphosate comercial Roundup®, de tal forma que a concentração final do herbicida seria equivalente a dose comercial de 720 g

e.a.ha⁻¹, com um volume de calda de 300 L.ha⁻¹. Um total de 3,33 KBq (estudos de absorção e translocação) e 5,0 KBq (metabolismo) foram aplicados em cada planta.

5.2.2 Metodologia para os estudos de absorção e translocação do glyphosate

Sementes de *C. benghalensis*, *I. grandifolia*, *A. hybridus* e *G. max*, (R e S) foram semeadas separadamente em vasos com capacidade de 200 mL, contendo areia e matéria orgânica na proporção de 3:1. Os vasos foram mantidos em uma câmara de crescimento com temperatura dia/noite de 32/18°C, respectivamente, fotoperíodo de 16 horas de luz (350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e umidade relativa constante de 80%, irrigando-se diariamente, visando a manutenção da umidade do solo satisfatória. Estabeleceu-se a densidade de duas planta por vaso, buscando uma uniformidade com relação à área foliar e estágio de desenvolvimento, a fim de minimizar a variabilidade experimental. As plantas foram tratadas em laboratório quando apresentavam quatro folhas definitivas, com ¹⁴C-glyphosate em mistura com glyphosate comercial, aplicado sobre a face adaxial da segunda folha, na forma de quatro gotas de 0,5 μL cada uma, usando um microaplicador (Hamilton PB6000 Dispenser, Hamilton Co., Reno NV), totalizando 3,33 K bq em cada planta.

Após a aplicação do herbicida, a absorção e translocação foram estudadas em diferentes períodos (2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após tratamento com o herbicida (HAT)), nos quais as plantas permaneceram em câmara de crescimento, nas condições já citadas. Após cada período, as plantas foram retiradas dos vasos e divididas em diferentes partes (folha tratada, demais folhas, caule e raiz), com o objetivo de quantificar a radioatividade em cada uma delas. As folhas tratadas foram lavadas com 3 mL de metanol 80%, a fim de eliminar o herbicida não absorvido. O líquido proveniente desta lavagem foi misturado com líquido de cintilação e levados para posterior medição da radioatividade residual. As outras partes das plantas

foram secas separadamente por 48 horas a 50 °C e submetidas posteriormente a combustão em um oxidador Packard Sample Oxidizer Modelo 307.

A combustão se realizou em uma atmosfera rica em oxigênio, de forma que todo ^{14}C presente nas amostras fosse convertido na forma de $^{14}\text{CO}_2$. O $^{14}\text{CO}_2$ desprendido passou através de uma coluna que continha Carbosob como suporte, substância capaz de retê-lo e transformá-lo em carbamato. As amostras de carbamato resultantes de cada tratamento foram coletadas individualmente e adicionadas a 5 mL de líquido de cintilação (Permafluor). A radioatividade contida neste meio foi posteriormente medida em espectrômetro de cintilação líquida, modelo Beckman LS 6000 TA.

A quantidade de herbicida absorvida foi calculada pela equação:

$$\% H abs = \frac{{}^{14}\text{C} tec.ox.}{{}^{14}\text{C} tec.ox. + {}^{14}\text{C} lav.}} \times 100$$

Onde:

H abs = herbicida absorvido pelas plantas

$^{14}\text{C} tec.ox.$ = quantidade de ^{14}C detectado nos tecidos oxidados

$^{14}\text{C} lav.$ = quantidade de ^{14}C detectado na lavagem da folha tratada

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada período de avaliação. O experimento foi repetido duas vezes. A radioatividade presente em todas as partes das plantas, exceto na folha tratada, foi considerada como translocada. Foram calculadas as médias das quatro repetições, juntamente com os respectivos erros padrões e para os estudos de translocação foram também calculadas as diferenças mínimas significativas (D.M.S_{0,05%}).

5.2.3 Metodologia para os estudos do metabolismo de glyphosate

Plantas de *C. benghalensis*, *I. grandifolia* e *A. hybridus* se desenvolveram em câmara de crescimento, nas mesmas condições descritas nos estudos de

absorção e translocação. A mistura de glyphosate comercial e ^{14}C -glyphosate foi aplicada sobre a superfície adaxial da segunda folha definitiva de cada planta, na forma de quatro gotas de 0,5 μL cada uma, usando um microaplicador (Hamilton PB6000 Dispenser, Hamilton Co., Reno NV), totalizando 5,5 KBq /planta.

Seguindo a aplicação de ^{14}C -glyphosate, as plantas foram transferidas novamente para câmara de crescimento e foram avaliadas a 72 HAT. As folhas tratadas foram lavadas com metanol 80%, para medir da radioatividade não penetrada na folha. A seguir as plantas foram separadas em parte aérea e raiz; sendo que, estas últimas não foram utilizadas neste experimento, já que no período máximo de avaliação havia ainda pouca radioatividade presente no sistema radicular. As partes aéreas foram inicialmente maceradas na presença de N_2 líquido, e homogeneizadas usando 3 mL de metanol 80%. A seguir, foram submetidas a centrifugação (14000 g, 4°C por 10 minutos) e alíquotas do sobrenadante foram analisadas, calculando-se a radioatividade. Após separar o precipitado do sobrenadante, o primeiro foi novamente lavado com metanol 80% até que não fosse mais possível extrair radioatividade (repetiu-se este processo pelo menos três vezes). Os sobrenadantes de cada uma das amostras foram secos por uma corrente de N_2 , a uma pressão de 10 Kpa, e temperatura de 40 °C. O extrato seco foi ressuspendido em 500 μL de metanol 80%, e cerca de 250 μL foi analisado por cromatografia de camada delgada, baseando-se no trabalho de Sprankle et al. (1978). Foram utilizadas placas de sílica gel de 20x20 cm e 250 μm (Merck, Sílica gel 60), e como fase móvel utilizou-se uma mistura de etanol: água: 15N NH_4OH : TCA: 17N ácido acético. As zonas radioativas, com seus respectivos valores de Razão de Fluxo (Rf), foram detectadas por um radioanalisador Berthol, LB 2821, com suporte informático do programa Berthol Chroma-1D, instalado em um computador conectado ao analisador. Os picos obtidos pela cromatografia foram separados e identificados de acordo com os valores de (Rf) disponíveis (glyphosate= 0,24 e ácido aminometilfosfônico AMPA=0,45), segundo Sprankle et al. (1978).

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Absorção e translocação do glyphosate

Nas plantas de soja, a absorção do glyphosate pelas folhas até 72 HAT alcançou cerca de 97% do produto aplicado (Figura 1), independente de ser R ou S. A translocação foi detectada desde 12 HAT, quando se observou cerca 4% do glyphosate absorvido presente nas raízes. A 72 HAT, 80% do glyphosate aplicado na soja S e 78% na soja R não foi translocado, ou seja, permaneceu na folha tratada, e 8,5% e 11% respectivamente foram encontrados nas raízes da soja S e R (Tabelas 1 e 2). A absorção de ^{14}C -glyphosate em *Sorghum halepenses* (L.) Pers e *Elytrigia repens* (L.) Nevski variou de 7 a 74% durante os períodos de 48 e 120 horas de exposição (Devine et al., 1983; Mcwhorter et al., 1980; Wills, 1978). Em *A. hybridus* o comportamento foi similar à cultura de soja, ou seja, a absorção aumentou com o tempo após aplicação; sendo que, a 72 HAT pode se observar a penetração de 93,5% glyphosate (Figura 1). A translocação aumentou de maneira efetiva a partir das 12 HAT, até às 72 HAT, quando cerca de 69,3% do ^{14}C -glyphosate estava presente na folha tratada (não translocado) e aproximadamente 7,2; 11,2 e 6,7% de glyphosate na parte aérea, caule e raiz, respectivamente (Tabela 3).

Em *I. grandifolia*, a penetração de glyphosate foi de 80% (Figura 1), entretanto, a taxa de translocação foi a menor quando comparadas com todas as plantas estudadas; a 72 HAT, 68,5% do herbicida absorvido estava presente na folha tratada e 2,2; 4,3 e 4,9% foram observados na parte aérea, caule e raiz, respectivamente (Tabela 4). Chachalis et al., (1999) observou o controle ineficaz de *Ipomoea* spp pelo herbicida glyphosate, sugerindo que, em culturas transgênicas de soja e algodão resistentes ao glyphosate, o controle de *Ipomoea* spp deve ser feito com herbicidas alternativos.

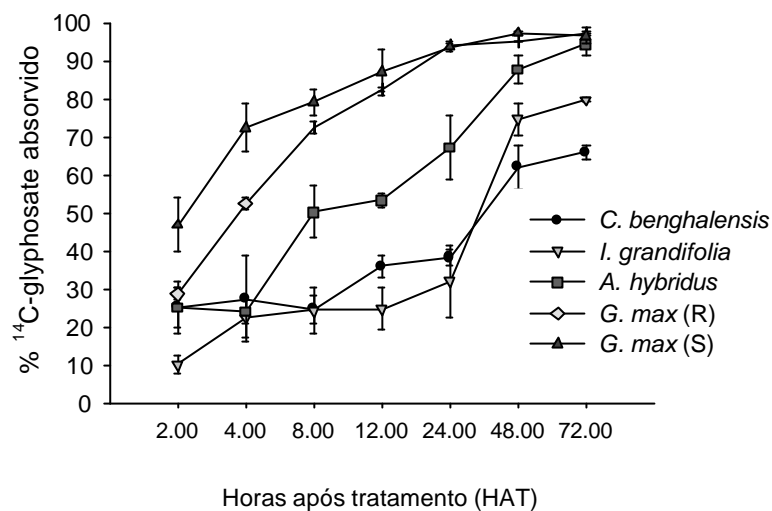


Figura 1 - Absorção de glyphosate nas plantas de *C. benghalensis*, *I. grandifolia*, *A. hybridus*, e *G. max* R e S

A planta daninha *C. benghalensis* apresentou absorção inicial relativamente lenta, com aumento a partir das 24 HAT; sendo que, as 72 HAT a taxa de absorção foi de 66,1% do ¹⁴C-glyphosate aplicado (Figura 1). Portanto, um dos mecanismos de tolerância desta planta daninha é a absorção diferencial do herbicida, que foi a menor obtida entre as plantas estudadas. Entretanto, parece não haver barreiras para a translocação, já que a 72 HAT, foram encontrados 15,1% do glyphosate na parte aérea e 11,2% nas raízes (Tabela 5).

Tabela 1. Taxa de translocação do ^{14}C glyphosate (% do ^{14}C absorvido) pela *Glycine max* (S), em função do tempo após a aplicação (HAT). Os valores de desvio padrão estão entre parênteses

HAT	Folha tratada	Folhas	Caule	Raíz
2	45,29 (± 10)	0,50 ($\pm 0,09$)	0,55 ($\pm 0,65$)	0,43 ($\pm 0,28$)
4	70,92 ($\pm 5,34$)	0,25 ($\pm 0,02$)	0,84 ($\pm 0,48$)	0,61 ($\pm 0,14$)
8	77,32 ($\pm 6,51$)	0,26 ($\pm 0,10$)	0,35 ($\pm 0,11$)	0,50 ($\pm 0,02$)
12	83,89 ($\pm 6,40$)	1,02 ($\pm 0,04$)	0,95 ($\pm 0,78$)	1,19 ($\pm 0,97$)
24	84,88 ($\pm 1,17$)	1,26 ($\pm 0,80$)	4,45 ($\pm 0,80$)	7,03 ($\pm 1,59$)
48	80,77 ($\pm 0,65$)	4,50 ($\pm 0,18$)	4,36 ($\pm 0,66$)	6,97 ($\pm 2,08$)
72	80,71 ($\pm 5,37$)	2,13 ($\pm 0,61$)	5,40 ($\pm 1,18$)	8,53 ($\pm 3,56$)
D.M.S (5%)	30,61	0,69	1,99	2,90

Em condições favoráveis, o glyphosate penetra rapidamente nas folhas. Sprankle et al. (1975) aplicaram ^{14}C -glyphosate na concentração de 4,4 g L⁻¹, contendo 0,8% de surfactante na planta *Agropyron repens*. Em 4 horas, 34% do glyphosate aplicado havia penetrado, mas durante as próximas 44 horas o processo foi muito lento. Trabalhando com folhas de *Apocynum cannabinum*, Schultz & Burnside (1980) encontraram taxas de absorção de 19, 36 e 53% nos períodos de 12 horas, 3 e 12 dias, respectivamente. Os valores de translocação apresentados a seguir foram retirados do trabalho de Sandberg et al. (1980) e correspondem ao ^{14}C translocado para fora da folha tratada com ^{14}C -glyphosate após 14 dias do tratamento: *Cirsium arvensis* (3,5%), *C. sepium* (21,6%), *I. purpurea* (6,5%) e *P. convolvulus* (5,0%), estes valores foram expressos em porcentagem do ^{14}C aplicado.

Tabela 2. Taxa de translocação do ^{14}C glyphosate (% do ^{14}C absorvido) pela *Glycine max* (R), em função do tempo após a aplicação (HAT). Os valores de desvio padrão estão entre parênteses

HAT	Folha tratada	Folhas	Caule	Raiz
2	23,37 ($\pm 7,29$)	0,31 ($\pm 0,19$)	0,55 ($\pm 0,11$)	0,28 ($\pm 0,06$)
4	51,19 ($\pm 6,03$)	0,32 ($\pm 0,08$)	0,57 ($\pm 0,33$)	0,26 ($\pm 0,13$)
8	67,02 ($\pm 6,80$)	0,96 ($\pm 1,39$)	2,48 ($\pm 0,48$)	1,95 ($\pm 0,01$)
12	76,54 ($\pm 3,80$)	1,55 ($\pm 0,43$)	3,10 ($\pm 0,09$)	1,72 ($\pm 0,10$)
24	80,15 ($\pm 5,65$)	1,91 ($\pm 1,44$)	5,78 ($\pm 0,80$)	6,76 ($\pm 0,59$)
48	70,86 ($\pm 0,99$)	10,94 ($\pm 0,09$)	4,18 ($\pm 1,15$)	7,83 ($\pm 2,31$)
72	78,81 ($\pm 5,30$)	1,33 (0,71)	5,05 ($\pm 1,93$)	11,86 ($\pm 3,90$)
D.M.S (5%)	22,70	1,50	2,65	2,86

Tabela 3. Taxa de translocação do ^{14}C glyphosate (% do ^{14}C absorvido) por *Amaranthus hybridus*, em função do tempo após a aplicação (HAT). Os valores de desvio padrão estão entre parênteses

HAT	Folha tratada	Folhas	Caule	Raiz
2	24,55(±2,80)	0,31 (±0,11)	0,26 (±0,18)	0,16 (±0,05)
4	23,62 (± 0,08)	0,23 (±0,15)	0,08 (±0,04)	0,21 (±0,08)
8	48,31(± 1,40)	0,62 (±0,36)	0,90 (±0,42)	0,93 (±0,31)
12	51,44(±11,00)	0,50 (±0,30)	1,15 (±0,15)	1,20 (±0,26)
24	58,57 (±1,40)	2,73 (±1,12)	3,06 (±1,59)	2,97 (±1,52)
48	70,38 (±4,30)	3,79(±3,52)	5,30 (±2,77)	8,31 (±3,44)
72	69,32 (±2,70)	7,27 (±4,83)	11,25 (±7,44)	6,72 (±3,44)
D.M.S (5%)	40,61	6,37	8,50	4,38

Tabela 4. Taxa de translocação do ^{14}C glyphosate por *Ipomoea grandifolia*, em função do tempo após a aplicação (HAT). Os valores de desvio padrão estão entre parênteses.

HAT	Folha tratada	Folhas	Caule	Raiz
2	9,10 ($\pm 2,62$)	0,31 ($\pm 0,19$)	0,22 ($\pm 0,11$)	0,71 ($\pm 0,51$)
4	21,53 ($\pm 2,10$)	0,29 ($\pm 0,14$)	0,16 ($\pm 0,03$)	0,32 ($\pm 0,01$)
8	22,14 ($\pm 2,10$)	0,54 ($\pm 0,12$)	0,64 ($\pm 0,20$)	1,53 ($\pm 0,48$)
12	22,21 ($\pm 9,30$)	0,55 ($\pm 0,14$)	0,66 ($\pm 0,07$)	1,54 ($\pm 0,14$)
24	31,42 ($\pm 10,5$)	1,05 ($\pm 0,21$)	0,83 ($\pm 0,19$)	1,81 ($\pm 0,29$)
48	69,90 ($\pm 1,06$)	2,66 ($\pm 0,34$)	1,85 ($\pm 0,73$)	2,09 ($\pm 0,39$)
72	68,32 ($\pm 4,03$)	2,23 ($\pm 0,20$)	4,36 ($\pm 2,73$)	4,91 ($\pm 0,90$)
D.M.S (5%)	13,6	0,6	3,0	2,0

Tabela 5. Taxa de translocação do ^{14}C glyphosate (% do ^{14}C absorvido) por *Commelina benghalensis*, em função do tempo após a aplicação (HAT). Os valores de desvio padrão estão entre parênteses

HAT	Folha tratada	Folhas	Raiz
2	24,08 ($\pm 2,62$)	0,40 ($\pm 0,20$)	0,34 ($\pm 0,02$)
4	26,14 ($\pm 8,40$)	0,52 ($\pm 0,11$)	0,36 ($\pm 0,08$)
8	23,29 ($\pm 2,70$)	0,54 ($\pm 0,21$)	0,22 ($\pm 0,02$)
12	24,04 ($\pm 8,70$)	0,64 ($\pm 0,01$)	0,32 ($\pm 0,02$)
24	35,36 ($\pm 10,23$)	1,41 ($\pm 0,71$)	0,74 ($\pm 0,16$)
48	53,98 ($\pm 10,23$)	1,44 ($\pm 0,60$)	6,70 ($\pm 2,30$)
72	68,32 ($\pm 4,03$)	15,10 ($\pm 1,70$)	11,23 ($\pm 0,68$)
D.M.S (5%)	29,90	2,22	2,65

5.3.2 Estudo do metabolismo do glyphosate

Não foram detectados metabólitos do glyphosate (AMPA) nos extratos das plantas de *I. grandifolia* e *A. hybridus*, à 72 HAT do tratamento com ^{14}C -glyphosate (Figuras 4A e 3B). Na Tabela 6 observa-se que 70,4 e 82,9% da radioatividade extraída destas plantas daninhas foi encontrada na forma do herbicida glyphosate, cujo pico padrão pode ser observado na Figura 3A, com valores de Rf variando de 0,24 – 0,32. Análises de extrato provenientes de plantas de *C. benghalensis* indicaram 40,8% de metabolismo do herbicida (Tabela 6). Nesta planta daninha a análise a 72 HAT indicou dois picos diferentes, com valores de Rf de 0,24 e de 0,45 (Figura 4B). De acordo com Sprankle et al. (1978) estes valores correspondem aos valores de Rf do ^{14}C -glyphosate padrão e do ácido aminometilfosfônico (AMPA), respectivamente. A

rota de degradação deste herbicida em plantas superiores não é bem compreendida. Alguns estudos têm sugerido que o metabolismo de glyphosate não ocorre (Mallik et al., 1989) enquanto, outros estudos mostram que a transformação química deste herbicida pode ocorrer.

Os resultados publicados sobre metabolismo de glyphosate são divididos em dois grupos: aqueles que não encontraram metabolismo e aqueles estudos nos quais foram detectados metabólitos (principalmente o AMPA). A inability para detectar metabólitos em extratos de plantas não significa que não houve metabolismo. A decomposição do herbicida para CO₂ pode envolver a subsequente perda de glyphosate pela planta. Por outro lado perda de glyphosate (ou de ¹⁴C) não necessariamente significa uma perda degradativa. Este herbicida, como outros herbicidas móveis no floema, é conhecido por ser exudado das raízes e folhas tratadas na forma de molécula intacta (Rodrigues et al., 1982).

Tabela 6. Identificação e quantificação, nos extratos das plantas, de glyphosate e de AMPA com relação a radioatividade aplicada 72 HAT

Plantas	glyphosate	AMPA
<i>C. benghalensis</i>	30,9	40,8
<i>I. grandifolia</i>	70,3	nd
<i>A. hybridus</i>	82,9	nd

Obs: Glyphosate (Rf = 0,24 – 0,32), AMPA (0,41 – 0,44), nd = não detectado.

Komoba et al. (1992) observou metabolismo de glyphosate a AMPA em algumas plantas como soja, trigo, milho e tabaco. Exudatos de raízes de *Agropyron repens* foram examinados por Coupland & Caseley (1979), oito dias após o tratamento com glyphosate radioativo através de cromatografia de camada delgada, observaram apenas uma área radioativa que correspondia ao

herbicida. Resultado similar foi encontrado por Rodrigues et al. (1982) no estudo de metabolismo em trigo

Sandberg et al. (1980) observaram metabolismo deste herbicida em *Ipomoea purpurea* e *Cirsium arvense*, sendo que o metabólito AMPA, foi encontrado em uma taxa de 11%.

Em algumas espécies de plantas o glyphosate é metabolizado, enquanto que em outras, ele é detectado como molécula intacta. Estas diferenças podem ocorrer por diversas razões e pesquisas usando técnicas de análise e identificação mais apuradas são necessárias para se estabelecer se estes efeitos ocorrem realmente devido a um metabolismo diferencial do glyphosate.

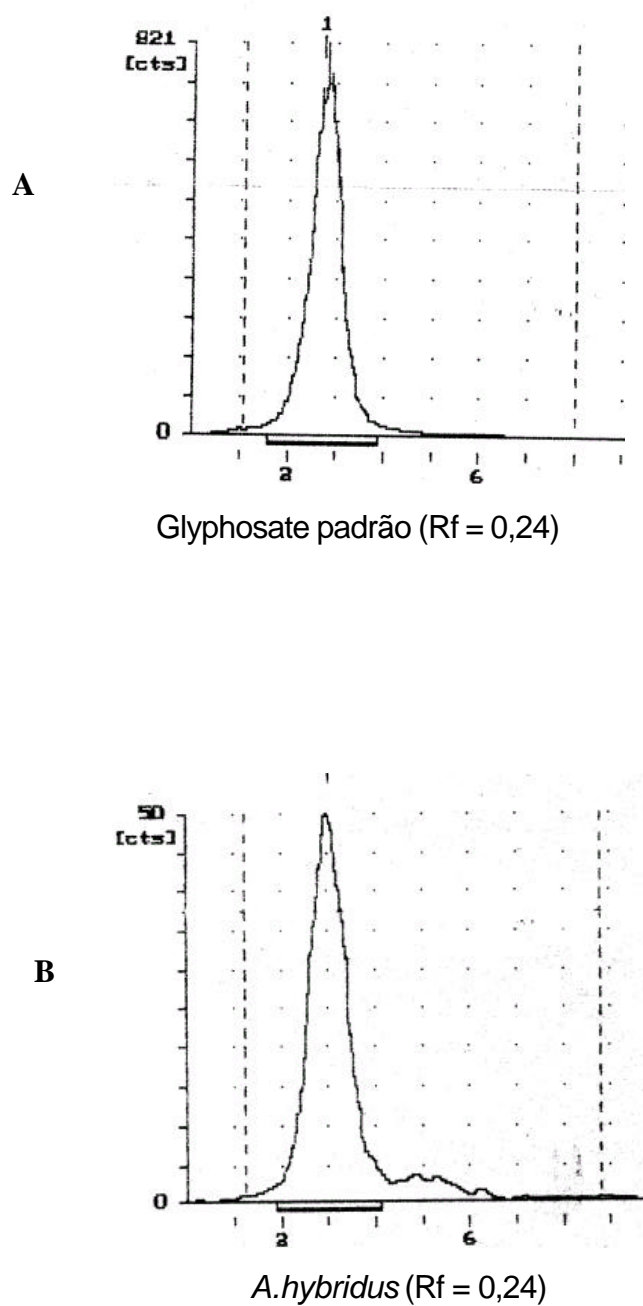
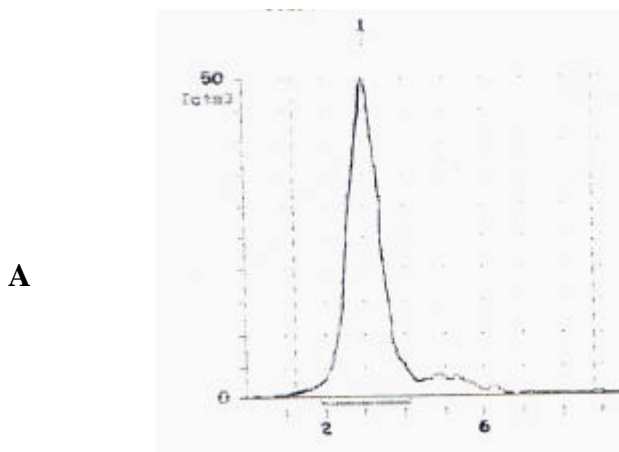
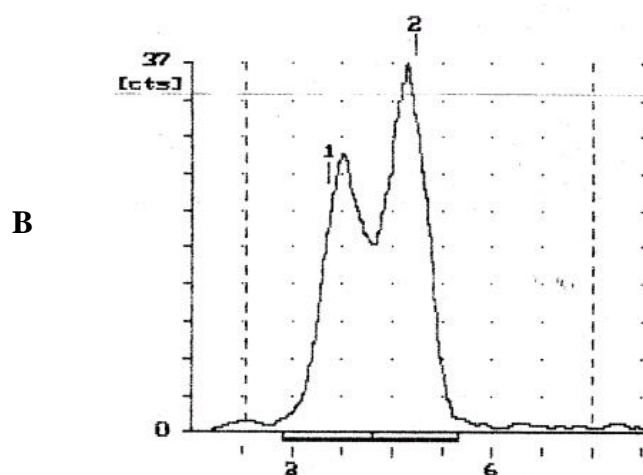


Figura 2- Cromatogramas correspondentes ao glyphosate padrão (A) e ao extrato de *A. hybridus* (B) 72 HAT com ^{14}C -glyphosate. As linhas tracejadas verticalmente indicam inicio e fim da leitura das cromatoplas



I. grandifolia (Rf = 0,27)



C. benghalensis (Rf= 0,27 e 0,45)

Figura 3- Cromatogramas correspondentes aos extratos de *I. grandifolia* (A) e *C. benghalensis*, (B) 72 HAT com ^{14}C -glyphosate. As linhas tracejadas verticalmente indicam inicio e fim da leitura das cromatoplacas

5.4 Conclusões

- a) Existe absorção, translocação e metabolismo diferencial do herbicida glyphosate entre as espécies de plantas daninhas, sendo que esta diferença poder ser responsável pela tolerância de algumas espécies de plantas daninhas ao herbicida.
- b) As plantas de *G. max* R e S e a planta daninha *A. hybridus* apresentam altas taxas de absorção do ¹⁴C-glyphosate até 72 HAT, sendo que, entre as plantas de soja R e S não há diferenças significativas. A translocação de glyphosate à partir da folha tratada, foi ao redor de 25%.
- c) Em *I. grandifolia* a absorção é de 80% do ¹⁴C-glyphosate aplicado, no entanto, a translocação (10,3%), comparativamente com plantas suscetíveis, sendo este, provavelmente, um fator que influencia na tolerância desta planta daninha a este herbicida.
- d) Em *C. benghalensis*, ocorre uma menor absorção do herbicida, a 72 HAT (66%), porém não parece haver uma barreira na translocação do glyphosate (26,90%).
- e) Nos estudos de metabolismo não são encontrados metabólitos do glyphosate em *I. grandifolia* e *A. hybridus*, porém em *C. benghalensis* parece haver a presença do metabólito AMPA a 72 HAT em concentrações significativas; sendo este um mecanismo de tolerância desta planta daninha ao herbicida.
- f) O entendimento dos mecanismos de tolerância de plantas daninhas ao glyphosate, ou seja, absorção, translocação ou metabolismo diferencial pode auxiliar na decisão de estratégias alternativas de manejo de plantas daninhas tolerantes.

6 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE FOLIAR E DAS CERAS EPICUTICULARES EM *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus*.

Resumo

Este estudo teve o objetivo de caracterizar a superfície foliar e a composição de ceras epicuticulares das plantas daninhas *Commelina benghalensis* L., *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Don. e *Amaranthus hybridus* L. As ceras epicuticulares foram extraídas, quantificadas ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) e empregadas em cromatografia de camada delgada a fim de se determinar a composição química. Partes centrais das folhas destas plantas daninhas foram submetidas a microscopia eletrônica de varredura para a caracterização da superfície foliar adaxial e abaxial. Em *A. hybridus* as ceras são constituídas basicamente por substâncias hidrofílicas (álcool, ésteres), sendo que a superfície foliar não apresenta tricomas ou glândulas, e com uma grande quantidade de estômatos e as ceras formando de pequenos grânulos. *I. grandifolia* apresenta ceras epicuticulares essencialmente hidrofílicas e superfície foliar rugosa, sem tricomas e sem a presença de cristais de ceras. Em *C. benghalensis*, as ceras apresentam na sua constituição química, os hidrocarbonos (n-alcanos), sendo, portanto, relativamente mais hidrofóbica, o que pode ter influenciado na menor penetração de glyphosate. A superfície foliar apresenta tricomas e estômatos recobertos pela cera epicuticular. É

possível observar também, a presença de ceras dispersas na superfície adaxial. Com bases nos dados obtidos pode-se concluir que um dos mecanismos de tolerância em *C. benghalensis* é a penetração diferencial devido à composição química das ceras epicuticulares, que apresenta componentes de natureza lipofílica em maior concentração que as demais espécies estudadas.

**LEAF SURFACE CHARACTERIZATION AND EPICUTICULAR WAX
COMPOSITION IN *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* AND
*Amaranthus hybridus***

Summary

This study had the objective of characterizing the foliar surface and the epicuticular wax composition of the weeds *Commelina benghalensis* L., *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Don and *Amaranthus hybridus* L. The epicuticular waxes were extracted, quantified ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) and submitted to thin layer chromatography in order to determine the chemical composition. Center parts of the leaves of these weeds were submitted to electron microscopy of to characterize the adaxial and abaxial foliar surface. In *A. hybridus* the waxes were constituted mostly by hydrophilic substances (alcohols, steres), and the foliar surface does not present trichomes or glandules, there is a great number of stomata and the waxes in small grains. *I. grandifolia* presents epicuticular waxes formed chemically by alcohols and steres and the foliar surface is rough, without tricommas and without wax crystals. In *C. benghalensis*, the waxes present in its chemical constitution, the hidrocarbons (n-alcanos), being relatively more hydrophobic, which can influence the lower penetration of glyphosate. The foliar

surface present trichomas and a lower number of stomata. All the stomata are recovered by epicuticular wax, it is possible to observe, the presence of disperse wax on the adaxial surface. Based on the data obtained it can be concluded that one of the tolerance mechanisms in *C. benghalensis* is the differential penetration due to the chemical composition the epicuticular waxes, that contain lipophilic components in higher concentration than the other studied species.

6.1 Introdução

Como consequência da evolução química e biológica, os organismos vivos têm desenvolvido uma série de estruturas de natureza polimérica que isolam e os protegem do meio externo. Nas plantas superiores esta função é assumida pela cutícula vegetal ou membrana cuticular (Heredia et al., 1998). De forma geral, desde o interior até o exterior, a membrana é constituída por cutícula secundária (capa cuticular cutinizada), cutícula primária (cutícula propriamente dita) com ceras embebidas, e na parte mais externa, as ceras epicuticulares. A composição química da membrana cuticular é variada, sendo os componentes principais, a cutina e as ceras. A cutina é um biopoliéster insolúvel de elevado grau de entrecruzamento entre os ácidos graxos hidroxilados de cadeia longa que a compõem, enquanto que, as ceras aparecem embebidas neste polímero (intracelulares) ou depositadas no exterior da cutícula (epicuticulares). As ceras epicuticulares podem ser depositadas em uma variedade de formas físicas; em algumas plantas formam camadas finas, em outras plantas podem formar placas ou cristais de diferentes tamanhos e formas. Devido a sua composição química, que se reflete no grau de cristalinidade, e a possibilidade de constituir na superfície da membrana cuticular uma película que atua como interfase entre a célula vegetal e o meio, as ceras se destacam como a principal barreira protetora frente as perda de

água por transpiração excessiva, ação de patógenos, radiações solares e entradas de produtos químicos e contaminantes (Heredia et al., 1998).

O conhecimento das propriedades protetivas da cutícula requer também entendimento da composição das ceras cuticulares e da superfície foliar. Nos últimos anos, a composição qualitativa e quantitativa das ceras de mais de oitenta espécies de plantas e características da superfície foliar têm sido determinada. As taxas de absorção foliar e, portanto, da eficácia biológica da aplicação de pesticidas depende em grande parte, do tipo de estruturas encontradas nas folhas e da permeabilidade das cutículas de culturas e plantas daninhas (Baker, 1982).

O objetivo deste experimento foi caracterizar a superfície foliar e a composição das ceras epicuticulares das plantas daninhas *C. benghalensis*, *I. grandifolia* e *A. hybridus*, correlacionando com a absorção diferencial do glyphosate entre estas espécies de plantas daninhas.

6.2 Material e Métodos

Os estudos de caracterização das ceras epicuticulares e da superfície foliar foram conduzidos nos laboratórios e instalações do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidad de Málaga, Espanha, sob a orientação do Prof. Antonio Heredia e Rafael De Prado Amián.

6.2.1 Caracterização das ceras epicuticulares

As ceras epicuticulares foram extraídas de 20 plantas de *C. benghalensis*, *I. grandifolia* e *A. hybridus* que se desenvolveram em uma câmara de crescimento com temperatura dia/noite de 32/18°C, respectivamente, fotoperíodo de 16 horas de luz ($350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e umidade relativa constante de 80%, irrigando-se diariamente, visando a manutenção da umidade satisfatória. As análises foram feitas quando as plantas daninhas

apresentaram quatro folhas verdadeiras. As folhas de cada espécie de planta daninha foram introduzidas separadamente em placas com clorofórmio e metanol (90:10 mL) por trinta segundos agitando-se levemente. Estes procedimentos foram feitos cuidadosamente para se evitar a ruptura das folhas e a conseqüente liberação de clorofila e outros compostos. Os extratos obtidos foram filtrados e deixados evaporar sobre uma placa a 55°C até reduzir o volume para aproximadamente 15 mL. Esta solução (clorofórmio+ceras) foi transferida para vials de 25 mL de peso conhecido. O clorofórmio foi evaporado em temperatura ambiente e os vials foram mantidos para pesagem 2 e 4 dias após a obtenção do resíduo sólido (ceras). A quantificação das ceras foi expressa por quantidade de ceras por unidade de área foliar ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). Para isso, a área das folhas de cada espécie, utilizadas para a extração das ceras, foi medida através do aparelho fotoelétrico de medição de área foliar marca LICOR-3100. Foram feitas quatro repetições para cada espécie de planta daninha estudada.

Para a análise química das ceras, os resíduos sólidos (ceras) obtidos foram ressuspensos com 500 μL de clorofórmio e utilizados em cromatografia de camada delgada. Os extratos de cada espécie de planta daninha foram aplicados em dois volumes diferentes (250 μL e 500 μL) sobre cromatoplasas, TLC plates 5 X 10 cm Sílica gel 60 F₂₅₄, Merck, que foram previamente ativadas por aquecimento a 100°C. Como fase móvel se empregou 8mL de benzeno. Após a migração das amostras, a placa foi retirada do benzeno e banhada por uma mescla de TLC (94 mL de água, 6 mL de H₂SO₄, 1,5g de H₃Mo₁₂O₄₀P e 1 g de Ce₂(SO₄)₃). Por último, a placa foi seca, primeiro, em temperatura ambiente e posteriormente a 100°C para o aparecimento das bandas. Para a determinação do R_f (Razão de fluxo), segundo a fórmula sugerida por Collins et al. (1990): $R_f = (\text{Distância percorrida pela amostra}) / (\text{Distância percorrida pelo eluente})$, marcou-se a distância percorrida pela fase móvel e pelas bandas nas cromatoplasas.

6.2.2 Caracterização da superfície foliar por microscopia eletrônica de varredura

As plantas daninhas *C. benghalensis*, *I. grandifolia* e *A. hybridus*, desenvolvidas em condições já mencionadas, apresentando quatro folhas verdadeiras foram utilizadas neste experimento. Amostras de 1cm² foram cortadas da região central de folhas jovens, porém totalmente expandidas; estes pedaços de folhas foram fixados em pequenos cilindros de alumínio (stubber) e foram recobertas com uma capa de ouro de espessura de 0,05 µm. Desta forma, as amostras foram observadas com um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-840 (Jeol-Japão), empregando-se 15 kV e sendo fotografadas as melhores imagens.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Caracterização das ceras epicuticulares

A quantidade de ceras por unidade de área foliar foi maior em *I. grandifolia* (37,0 µg.cm⁻²), seguida por *C. benghalensis* (34,5 µg.cm⁻²), e *A. hybridus* (31,7 µg.cm⁻²) (Tabela 1). A quantidade de ceras epicuticulares na maioria das espécies varia de 10 a 200 µg.cm⁻² (McWhorter, 1993), embora quantidades acima de 300 µg.cm⁻², já tenham sido relatadas (Baker 1982).

Tabela 1. Quantidade de ceras epicuticulares (µg.cm⁻²) nas plantas daninhas estudadas

Plantas Daninhas	Quantidade de ceras epicuticulares (µg.cm ⁻²)
<i>C. benghalensis</i>	34,1
<i>I. grandifolia</i>	37,0
<i>A. hybridus</i>	31,7

As ceras epicuticulares de *A. hybridus*, *C. benghalensis* e *I. grandifolia* são constituídas de maneira geral de hidrocarbonos, álcoois e ésteres, com uma clara distinção entre as espécies de plantas daninhas (Figura 1). Em *C. benghalensis* as ceras epicuticulares possuem na sua composição n-alcanos ($R_f=0,9$), que são compostos altamente hidrofóbicos. É importante lembrar que o glyphosate é altamente hidrofílico (Arnaud et al., 1994), portanto, uma das razões da menor absorção do glyphosate por esta planta daninha (66% do ^{14}C -glyphosate aplicado é absorvido), é a composição química das ceras epicuticulares. De acordo com Hamilton (1995), os hidrocarbonos (n-alcanos) estão presentes em quase toda a superfície lípida das plantas variando quantitativamente de traços até 50% de toda a planta, entretanto, são predominantes em poucos casos. As ceras em *I. grandifolia* e *A. hybridus* são compostas basicamente por álcoois e ésteres. Estes compostos não são barreiras na penetração do herbicida glyphosate, já que são hidrofílicos. Os álcoois são, na maioria dos casos, os principais componentes das ceras, variando de pequenas porcentagens até 60% das ceras totais, dependendo da espécie. Em plântulas de milho, por exemplo, constituem 63% de toda cera epicuticular, um valor que chega a 14% em folhas imaturas. Ésteres podem chegar até a 80% da cera total e os ácidos podem estar presentes em grande proporção, um exemplo, são as folhas de sorgo que possuem cerca de 40% de ácidos na composição das ceras epicuticulares (Hamilton, 1995).

A composição química das ceras epicuticulares é variável entre os distintos grupos filogenéticos, ocorrendo diferenças também, dentro dos mesmos grupos, espécies, ou nos diferentes estádios de crescimento de um mesmo indivíduo. Os principais componentes químicos das ceras epicuticulares são n-alcanos, ésteres, álcoois e ácidos graxos. A importância da composição química destas ceras está relacionada com a morfologia das mesmas. Os hidrocarbonos e álcoois primários, por exemplo, cristalizam na forma de placas, os álcoois secundários e as cetonas, cristalizam como túbulos, os aldeídos cristalizam na forma de grânulos e os dioles como pequenas tiras. No caso dos

triterpenóides e acil ésteres, não há a formação de cristais, as estruturas são majoritariamente amorfas (Chachalis, et al., 2001).

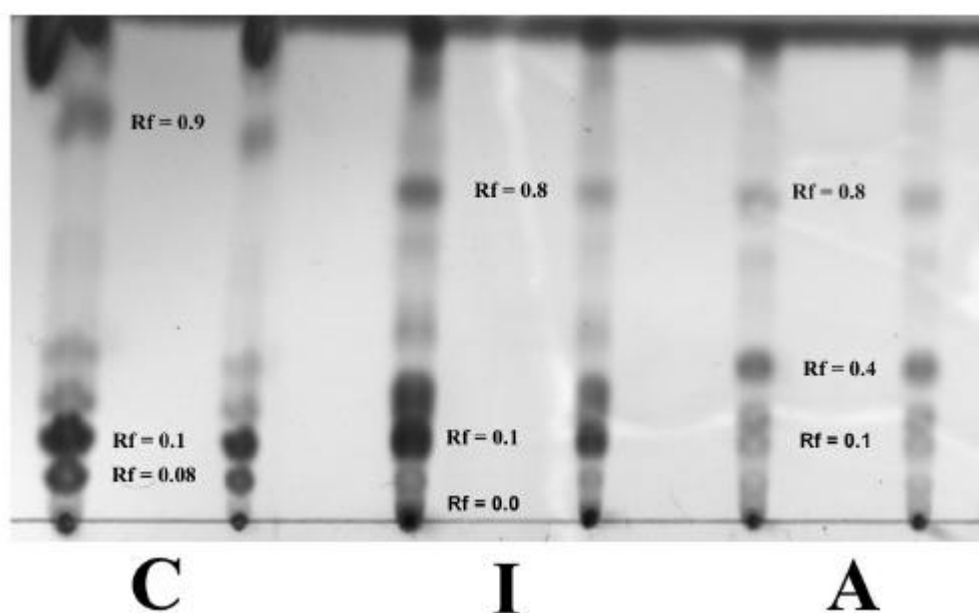


Figura 1- Cromatografia de camada delgada de ceras epicuticulares com valores de Rf. Quanto maior o valor de Rf mais apolar é o constituinte químico e, portanto, mais hidrofóbica é a cera. C= *C. benghalensis*; I= *I. grandifolia*; A= *A. hybridus*

Algumas pesquisas demonstraram que a composição das ceras pode mudar com a idade das plantas. Em *Sorghum halepenses* alcanos e ácidos aumentaram enquanto houve a diminuição de álcoois em ceras de folhas mais velhas (McWorter,1993). Portanto, pode-se correlacionar o fato da *C. benghalensis* ser mais tolerante ao glyphosate quando adulta devido a uma maior quantidade de alcanos nas folhas maduras.

6.3.2 Caracterização da superfície foliar por microscopia eletrônica de varredura.

As ceras epicuticulares são constituídas de um filme de cera amorfa, de onde emergem estruturas cristalinas de diferentes formas. As estruturas mais freqüentemente observadas são os túbulos, placas ou lamelas, bastonetes, filamentos, grânulos de forma determinada ou não. Apesar da morfologia das ceras ser controlada geneticamente, a quantidade e a distribuição podem ser modificadas pelas condições ambientais (Barthlott et al., 1998).

A superfície foliar das plantas daninhas *C. benghalensis*, *I. grandifolia* e *A. hybridus* diferem significativamente. A superfície adaxial de *C. benghalensis* apresenta alongados tricomas e um menor número de estômatos distribuídos em fileiras. Os estômatos estão recobertos por uma camada de cera epicuticular (Figura 2). O menor número e a obstrução dos estômatos pelas ceras de natureza hidrofóbica é uma provável causa da menor absorção do herbicida glyphosate através da membrana cuticular que cobre as células guardas. Pode-se observar também camadas de ceras na superfície adaxial em forma de filamentos pouco definidos. Em *I. grandifolia* a superfície adaxial de folhas jovens se apresentam de maneira rugosa, porém sem a presença de tricomas ou glândulas (Figura 3). Os estômatos estão sem qualquer tipo de obstrução e podem ser observados em maior quantidade, quando comparado a *C. benghalensis*. Deposição cristalina de ceras não são observadas, ceras amorfas também foram identificadas em outras espécies de plantas como *Vitis vinifera*, *Beta vulgares* e *Trifolium repens*. Todas estas espécies apresentaram um ponto em comum, que foi a grande quantidade de álcool primário na composição de ceras. Há a hipótese de que a natureza amorfa das ceras pode ser uma conseqüência da baixa quantidade de ceras na superfície foliar ou devido à composição química (Baker & Bukovac, 1971).

A superfície foliar de *A. hybridus* apresenta superfície lisa, sem a presença de tricomas ou glândulas, porém, pode-se observar uma grande quantidade de ceras granulares tanto na superfície adaxial como na abaxial. Os estômatos

estão em depressão em relação a superfície foliar e é possível também observar estruturas alongadas que a princípio imaginava-se que eram ceras tubulares, mas depois foi verificado que são cristais. As ceras se apresentam em forma de pequenos grânulos (Figura 4).

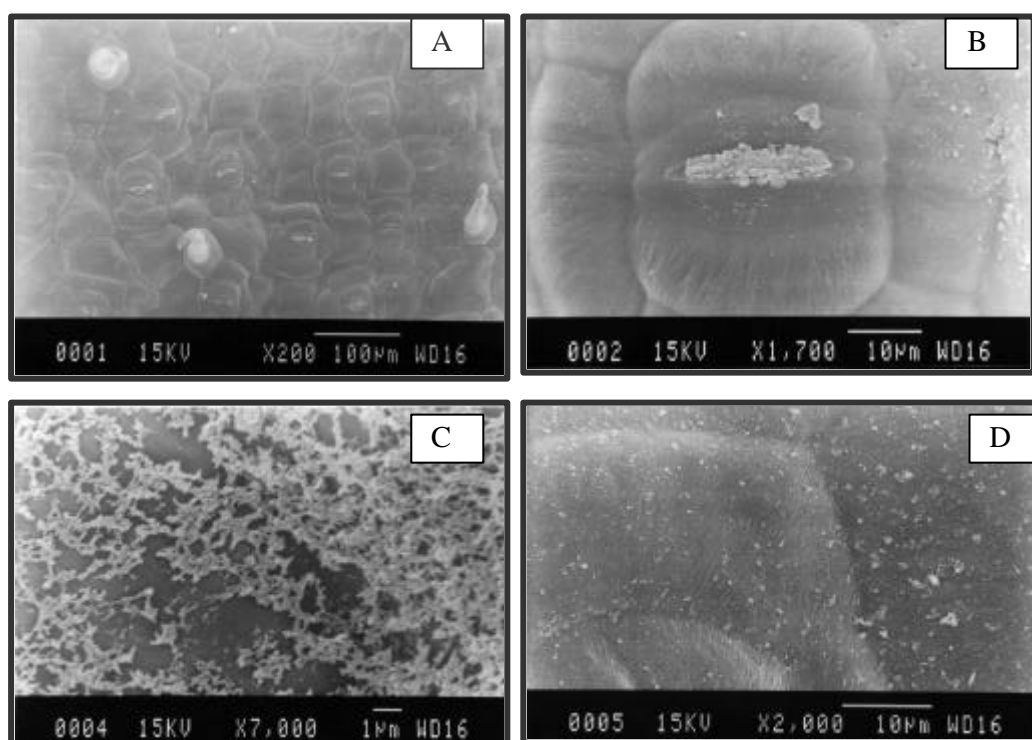


Figura 2- Superfície foliar de *C. benghalensis*. (A) vista geral da superfície adaxial; (B) detalhe de estômato recoberto por ceras; (C) detalhes das ceras epicuticulares da superfície adaxial e (D) detalhes das ceras na superfície abaxial

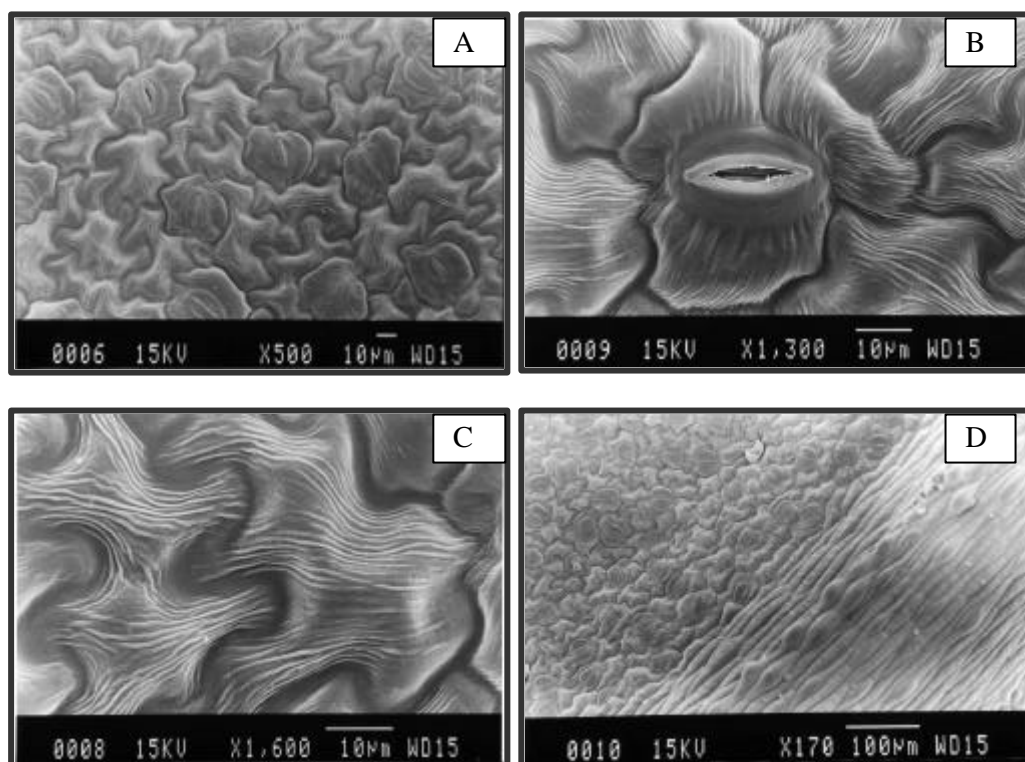


Figura 3- Superfície foliar de *I. grandifolia*. (A) vista geral da superfície adaxial; (B) detalhe de um estômato; (C) superfície adaxial sem presença de cristais de ceras e (D) detalhes da superfície abaxial.

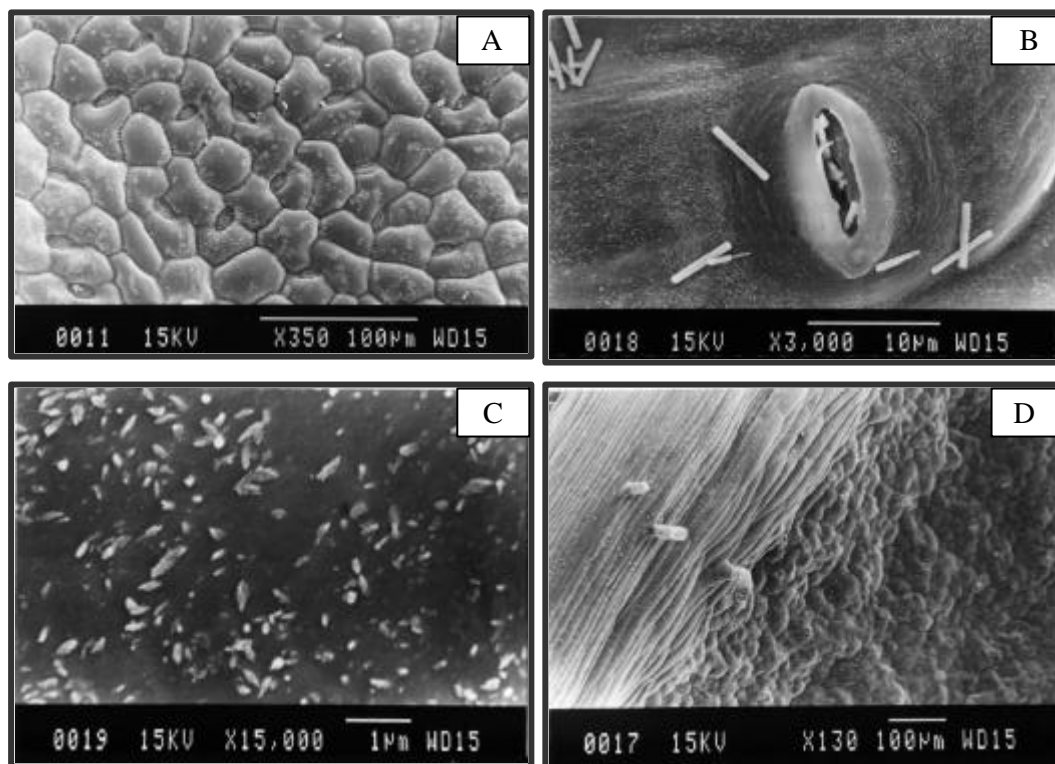


Figura 4- Superfície foliar de *A. hybridus*. (A) vista geral da superfície adaxial; (B) detalhe de um estômato com ceras ao redor; (C) superfície adaxial com cristais de ceras e (D) detalhes da superfície abaxial.

6.4 Conclusões

Uma das prováveis causas da menor absorção do glyphosate pela planta daninha *C. benghalensis*, ocorre devido à composição química das ceras epicuticulares relativamente mais hidrofóbica (n-alcanos) do que as ceras das plantas daninhas *A. hybridus* e *I. grandifolia*. Além disso, a superfície adaxial de *C. benghalensis* apresenta menor número de estômatos que estão recobertos por ceras epicuticulares, podendo dificultar a penetração do herbicida através da membrana cuticular sobre as células guardas.

7 CONCLUSÕES GERAIS

- a) Quando o glyphosate é aplicado repetitivamente como herbicida de manejo em uma área, pode modificar a composição específica de plantas daninhas, levando a predominância de espécies tolerantes como *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Richardia brasiliensis* e a diminuição da importância relativa de espécies suscetíveis como *Galisoga parviflora* e *Amaranthus hybridus*.
- b) Os herbicidas bentazon e sulfentrazone não devem ser utilizados em misturas com glyphosate, pois resultam em efeitos antogonísticos para o manejo de algumas espécies de plantas daninhas.
- c) A planta daninha *I. grandifolia* apresenta como provável mecanismo de tolerância a menor translocação do herbicida glyphosate. Em *C. benghalensis*, foi observada uma menor absorção do herbicida, porém não parece haver uma barreira a translocação do glyphosate.
- d) Apenas em *C. benghalensis* ocorre a presença do metabólito AMPA, indicando que o metabolismo diferencial juntamente com a menor absorção do herbicida são os mecanismos de tolerância desta planta daninha.
- e) A menor absorção do glyphosate pela planta daninha *C. benghalensis*, ocorre devido à composição química das ceras epicuticulares relativamente mais hidrofóbica (n-alcenos) do que as ceras das plantas daninhas *A. hybridus* e *I. grandifolia*. Além disso, a superfície adaxial de *C. benghalensis* apresenta menor número de estômatos que estão recobertos por ceras epicuticulares, diminuindo assim, a penetração do herbicida através da membrana cuticular sobre as células guardas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMRHEIN, N.; DEUS, B.; GEHRKE, P.; STEINRUCKEN H.C. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. **Plant Physiology**, v.66, p. 830-834, 1980.
- ANDERSON, K. S.; JOHNSON, K. A. Kinetic and structural analysis of enzyme intermediates from EPSPs. **Chemical Review**, v.90, p.1131-1149, 1990.
- APPLEY, A.P. SOMABHI, M. Antagonistic effect of atrazine and simazine on glyphosate activity. **Weed Science**, v.46, p.135-139, 1978.
- ARNAUD, L.; NURIT, F.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Distribution glyphosate and its target enzyme inside wheat plants. **Pesticide Science**, v. 40, p. 217-223, 1994.
- BAKER, E.A. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In: CUTLER, D.F.; ALVIN, K.L.; PRICE, C.E. (Ed.). **The plant cuticle**. London : Academic Press, 1982. p. 140-161.
- BAKER, E. A.; BUKOVAC, M. J. Characterization of the components of plant cuticles in relation to the penetration of 2,4-D. **Annals of Applied Biology**, v. 67, p.243-253, 1971.

- BALL, D.A. Weed seed bank response to tillage, herbicides, and crop rotation sequence. **Weed Science**, v. 40, n.4, p. 654-659, 1992.
- BALLARD, T.O; BAUMAN, T.T.; FOLEY, M.E. Germination viability and protein change during stratification of giant ragweed seed. **Journal of Plant Physiology**, v.149, p.229-232, 1996.
- BARRALIS, G.; CHADOEUF, R. LOCHAMP. J.P. Longevité dès semences dès mauvaises herbes annuelles dans um sol cultivé. **Weed Research**, v. 28, p. 407-417, 1988.
- BARTHLOTT, W.; NEINHUIS, C.; CUTLER, D.; DITSCH, F.; MEUSEL, I.; THEISEN, I.; WILHELMI, H. Classification and Terminology of Plant epicuticular waxes. **Botanical Journal of the Linnean**, v.126, p.237-260, 1998.
- BENOIT, D.L.; KENKEL, N.C.; CARVERS, P.B. Factors influencing the precision of soil seed bank estimates. **Canadian Journal of Botany**, v. 67, p.2833-2840, 1989.
- BENTLY, R. The shikimate pathway metabolic tree with many branches. *In*: FASMAN, G.D. (Ed.). **Critical review in biochemistry and molecular biology**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 307-384.
- BEZUTTE, A.J. Impacto do uso consecutivo de herbicidas sobre a comunidade infestante na cultura da soja. Jaboticabal, 1998. 98p. Dissertação (M.S)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho".

- BOERBOOM, C.M. No chemical options for delaying weed resistance to herbicide Midwest cropping systems. **Weed Technology**, v. 13, p.636-642, 1999.
- BUHLER, D.D.; MAXWELL, B.D. Seed separation and enumeration from soil using K₂CO₃ centrifugation and image analysis. **Weed Science**, v.41, p.298-302, 1993.
- BUHLER, D.D.; HARTZLER, R.G.; FORCELLA, F. Implications of weed seed bank dynamics to weed management. **Weed Science**, v. 45, p.329-336, 1997.
- BURNSIDE, O.C.; MOOMAW, R.S.; ROETH, F.W.; WICKS, G.A.; WILSON, R.G. Weed seed density in soil in weed free-corn (*Zea mays*) production across Nebraska. **Weed Science**, v. 34, n.2, p.248-251, 1986.
- CARDINA, J.; SPARROW, D.H. A comparison of methods to predict weed seedling populations from the soil seedbank. **Weed Science**, v. 44, p. 46-51, 1996.
- CARMONA, R. Problemática e manejo de banco de semente de invasoras em solos agrícolas. **Planta Daninha**, v.10, n.1, p. 5-13, 1992.
- CASELY, J.C.; COUPLAND, D. Environmental and plants factors affecting glyphosate uptake, movement and activity. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **Herbicide glyphosate**. London: Butterworth, 1985. p. 92-124.

- CAVERS, P.B.; BENOIT, D.L. Seed bank in arable land. In: LECK, M.A.; PARKER, V.T. SIMPSON, R.L (Ed.) **Ecology of soil seed banks**. New York: Academic Press, 1989, p. 309-328.
- CHACHALIS, D.; REDDY, K. N.; ELMORE, C. D. Characterization of leaf surface, wax composition, and control of redvine and trumpetcreeper with glyphosate. **Weed Science**, v. 49, p.156-163, 2001.
- CHACHALIS, D.; REDDY, K. N.; CARROL, E.; MARCUS, S. L. **Herbicide efficacy as related to leaf morphology, epicuticular wax and spray droplets in *Ipomoea* spp and *Jacquemontia tamnifolia***. <http://www.nal.usda.gov>. (31 Agosto 1999).
- CHADOEUF-HANNEL, R. La dormance chez les semences des mauvaises herbes. **Agronomie**, v. 5, p.761-772, 1985.
- CLEMENTS, D.R.; BENOIT, D.L.; MURPHY, S.D.; SWANTON, C.J. Tillage effects on weed seed return and seed bank composition. **Weed Science**, v. 44, p.314-322, 1996.
- COLBY, S.R. Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicides combinations. **Weeds**, v. 15, p.20-22, 1967.
- COLEN, D.J. Detoxification and activation of agrochemicals in plants. **Pesticide Science**, v.42, p. 209-222, 1994.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução aos métodos cromatográficos**. 4. ed. Campinas: UNICAMP, 1990. 279p.

- CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 23., Gramado, 2002. **Resumos**. Gramado: SBCPD, 2002. 718p.
- COUPLAND D.; CASELEY, D.C. Presence of ^{14}C activity in root exudates and guttation fluid from *Agropyron repens* treated with ^{14}C -glyphosate. **New Phytologist**, v. 83, p.17-22, 1979.
- COUPLAND, D. Metabolism of glyphosate in plants. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworth, 1985. p. 25-33.
- D'ANIERI, P.; ZEDAKER, S. M.; SEILER, J. R.; KREH, R. E. Glyphosate translocation and efficacy relationships in red maple, sweetgum and loblolly pine seedlings. **Forestry Science**, v. 36, p. 438-447, 1990.
- DAWSON, J.H.; BRUNS, V.F. Longevity of barnyardgrass green foxtail and yellow foxtail seeds in soil. **Weed Science**, v. 23, p. 437-440, 1975.
- DELLACIOPPA, G.; BAUER, S.C.; KLEIN, B. K.; SHAH, D. M.; FRALEY, R. T.; KISHORE, G. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 83, p. 6973-6877, 1986.
- DEGENNARO, F.P.; WELLER, S.C. Differential susceptibility of field bindweed (*Convolvulus arvensis*) biotypes to glyphosate. **Weed Science**, v. 32, p.472-476, 1984.
- DEUBER, R. Botânica das plantas daninhas. In: DEUBER, R. **Ciência das plantas daninhas**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. cap. 3, p. 31-73.

- DEVINE, M. D.; BANDEEN, J. D.; MCKERSIE, B. D. Temperature effects on glyphosate absorption, translocation and distribution in quackgrass (*Agropyron repens*). **Weed Science**, v.31, p. 461-464, 1983.
- DEVINE, M. D.; DUKE, S.O.; FEDTKE, C. Inhibition of amino acid biosynthesis. In: ENGLEWOOD, C. (Ed.). **Physiology of herbicide action**. New York: Prentice Hall, 1993. cap.13, p. 250-289.
- DILL, G.; BAERSON, S.; CASAGRANDE, L. Characterization of glyphosate resistant *Eleusine indica* biotypes from Malaysia. In: INTERNATIONAL WEED SCIENCE CONGRESS, 3., Foz do Iguaçu, 2000. **Abstracts**. Corvallis: IWSS, 2000.p.150.
- DURIGAN, J.C; GALLI, A.J.B.; LEITE, G.J. Avaliação da eficiência da mistura de glyphosate e 2,4D para o controle de plantas daninhas em citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS, 17., Piracicaba, 1988. **Resumos**. Piracicaba: SBEHD, 1988. p.303-304.
- DYER, W.E. Resistance to glyphosate. In: POWLES S.B.; HOLTUM J.A.M. (Ed.). **Herbicide resistance in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.229-241.
- ERICKSON, C.G.; DUKE, W.B. The effect of glyphosate and surfactant concentration on subsequent penetration and translocation in quackgrass. **Proceedings of the Northeastern Weed Science Society**, v.35, p.33, 1981.
- FENNER, M. **Seed ecology**. London: Chapman and Hall, 1985. 485p.

- FOLEY, M.E. Seed dormancy: an update on terminology, physiological genetics, and quantitative trait loci regulating germinability. **Weed Science**, v.49, p. 305-317, 2001.
- FRANZ, J.E. Discovery, development and chemistry of glyphosate. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworth, 1984. cap.1, p. 3-17.
- FRYER, J.D.; SMITH, P.D.; LUDWIG, J.W. Long term persistence of picloran in a sandy loam soil. **Journal of Environment Quality**, v.8, n.1, p. 83-85, 1982.
- GOTTRUP, O.; O'SULLIVAN, P.A.; SCHARAA, R.J.; VANDEN BORN, W.H. Uptake, translocation, metabolism and selectivity of glyphosate in Canada thistle and leafy spurge. **Weed Research**, v.16, p.1-10, 1976.
- GROSS, K.L. A comparison of methods for estimating seed numbers in the soil. **Journal of Ecology**, v.78, p. 1079-1093, 1990.
- GRUYS, K.J.; BIEST-TAYLOR, N.A.; FENG, P.C.C. Resistance to glyphosate in annual ryegrass (*Lolium rigidum*) II. Biochemical and molecular analyses. In: MEETING OF THE WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA, 39., San Diego, 1999. **Abstracts**. Lawrence: WSSA, 1999.p.82
- GRUYS, K. J.; MARZABADI, M. R.; PANSEGRAU, P. D.; SIKORSKI, J. A. Steady-state kinetic evaluations of the reverse reaction for *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.304, p. 345-351, 1993.
- HAMILTON R.J. **Waxes**: chemistry, molecular biology and functions. Edinburgh: Orly Press, 1995. 349p.

- HEREDIA, A.; CASADO, C.G.; LAGUNA, L.; REINA, L.L.; SERRANO, J.M.; DOMÍNGUEZ, E. La cutícula vegetal: estructura y funciones. **Ecología**, v.12, p.293-305, 1998.
- HESS, F.D.; CHESTER, L.F. Interaction of surfactants with plant cuticles. **Weed Technology**, v. 14, p. 807-813, 2000.
- HOFFMAN, M.L.; OWEN, M.D.K.; BUHLER, D.O. Effects of crop and weed management on density and vertical distribution of weed seeds in soil. **Agronomy Journal**, v. 90, p.793-799, 1988.
- HOLUB, M. Vertical structure of the soil seed bank below wheat, sugar beet and lucerne. **Biologia Bratislava**, v. 49, p.53-57.1994.
- HYDRICK, D.E.; SHAW, D.R. Effects of tank mix combinations of non-selective foliar and selective soil-applied herbicides. **Weed Technology**, v. 8, p.129-133, 1994.
- ISSACS, M.A.; MURDOCK E.C. TAYLOR, J.E. WALLACE, S.U. Effects of late season herbicide application on sicklepod (*Cassia obtusifolia*) seed production and viability. **Weed Science**, v. 37, p. 761-765, 1989.
- JOHNSON, R.G; ANDERSON, R.C. The seed bank of tall grass prairie in Illinois. **The American Midland Naturalist**, v.115, p.123-130.1986
- JORDAN, D.L.; YORK, A.C.; GRIFFIN, J.L.; CLAY, P.A.; VIDRINE, P.R.; REYNOLDS, D. B. Influence of application variables on efficacy of glyphosate. **Weed Technology**, v.11, p. 354-362, 1997.

- KAPUSTA, G., KRAUZ, R. F.; MATTHEWS, J. L. Soybean tolerance and summer annual weed control with glufosinate and glyphosate in resistant soybean. **Weed Science**, v. 49, p.120 -124, 1994.
- KELLEY, A.D.; BRUNS, V.F. Dissemination of weed seeds by irrigation water. **Weed Science**, v.23, p. 486 - 490, 1975.
- KIRKWOOD, R.C. Recent developments in our understanding of the plant cuticle as a barrier to the foliar uptake of pesticides. **Pesticide Science**, v.55, p. 69-77, 1999.
- KIRKWOOD, R.C.; MCKAY, I. Accumulation and elimination of herbicides in select crop and weed species. **Pesticide Science**, v.42, p. 241-249, 1994.
- KISSMANN, K.G; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira, 1992. v.2, 798p.
- KOMOBA, D., GENNITY, I.; SANDERMANN, H. Plant metabolism of herbicides with C-P bonds glyphosate. **Pesticide: Biochemistry and Physiology**, v. 43, p. 85-94, 1992.
- KRUSE, N.D.; TRESSI, M.M.; VIDAL, R.A. Herbicidas inibidores da EPSPs: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.2, p.139-146, 2000.
- LEOPOLD, A.C.; GLENIST. R.; COHN, M.A.; Relationship between water content and after ripening in red rice. **Physiologia Plantarum**, v.74, p. 659-662, 1998.

- LIAKOPOULOS, G., STAVRIANOKOU, S.; KARABOURNIOTIS, G. Analysis of epicuticular phenolics of *Prunus persica* and *Olea europea* leaves, evidence for the chemical origin of the u.v. induced blue fluorescence of stomata. **Annals of Botany**, v.87, p. 641-648, 2001.
- LICH, J. M.; RENNER, K. A.; PENNER, D. Interaction of glyphosate with postemergence soybeans (*Glycine max*) herbicides. **Weed Science**, v.45, p. 12-21, 1997.
- LORENZI, H. **Plantio direto no Brasil**. Fundação Cargill, 1984. cap.2, p. 13-16: Considerações sobre plantas daninhas no plantio direto.
- LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas**. 4. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1994. 309p.
- LUSCHEI, E.C.; BUHLER, D.D.; DEKKER, J.H. Effect of separating giant foxtail (*Setaria faberi*) seeds from soil using potassium carbonate and centrifugation on viability and germination. **Weed Science**, v.46, p.545-548, 1998.
- MACEDO, M. Dispersão de plantas lenhosas de uma campina amazônica. **Acta Amazônica**, v.7, n.1, p. 69-73, 1997.
- MALLIK, J.; BARRY, G. KISHORE, G. The herbicide glyphosate. **Biofactors**, v.1, p.17-25, 1989.
- MAYOR, J.P.; DESSAINT, F. Influence of weed management strategies on soil seedbank diversity. **Weed Research**, v. 38, p. 95-105, 1998.
- MCWHORTER, C. G.; OUZTS, C. Leaf surface morphology of *Erythroxylum* sp and droplet spread. **Weed Science**, v. 42, p. 18-26, 1993.

- MCWHORTER, C. G.; JORDAN, T. N.; WILLS, G. D. Translocation of ^{14}C glyphosate in soybeans (*Glycine max*) and johnsongrass (*Sorghum halepense*). **Weed Science**, v. 28, p. 113-118, 1980.
- MERVOSH, T.L.; BALKE, N.E. Effects of calcium, magnesium and phosphate on glyphosate absorption by cultured plant cells. **Weed Science**, v. 39, n.3, p. 347-353, 1991.
- NORSWORTHY, J.K.; BURGOS, N.R.; OLIVER, L.R. Differences in weed tolerance to glyphosate involve different mechanism. **Weed Technology**, v.14, p. 725-731. 2001.
- O'SULLIVAN, P.A.; O'DONOVAN, J.T. Interaction between glyphosate and various herbicides for broadleaved control. **Weed Research**, v. 20, p. 255-260.1980.
- PAPA, J.C.M.; FELIZIA, J.C.; ESTEBÁN, A.J. Cambios en la flora de malezas como consecuencia del cambio tecnologico en Argentina: malezas novedosas que pueden afectar al cultivo de la soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA E MERCOSOJA, 2., Foz do Iguaçu, 2002. **Anais**. Foz do Iguaçu: EMBRAPA, 2002. p.346-354.
- PEREIRA, W.; CRABTREE, G. Absorption, translocation and toxicity of glyphosate and oxyfluorfen in yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*). **Weed Science**, v. 34, p. 923-929, 1986.
- POWLES, S.B.; HOLTUM, J.A.M. **Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 1994. 353p.

- ROBERTS, H.A. Seed banks in the soil. In: ROBERTS, H.A. (Ed.). **Advances in applied biology**. Cambridge: Academic Press, 1981. v. 6, p. 1-55.
- ROBERTS, H.A. Weed seeds in horticultural soils. **Scientia Horticulturae**, v. 34, p. 1-11, 1983.
- RODRIGUES, J.V. Exudation of glyphosate from wheat (*Triticum aestevum*) plants and its effects on interplanted corn (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max*). **Weed Science**, v. 30, p. 316-320, 1982.
- RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. Londrina: IAPAR, 1998. 648p.
- RUEPPELL, M.L.; BRIGHTWELL, B.B.; SCHAEFER, J.; MARVEL, J.T. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 25, p. 517-528, 1977.
- SANDBERG, C. L.; MEGGITT, W. F.; PENNER, D. Absorption, translocation and metabolism of ¹⁴C- glyphosate in several weed species. **Weed Research**, v. 20, p. 195-200, 1980.
- SANTOS, I.C.; SILVA,A.A.; FERREIRA, F.A.; MIRANDA,G.V; PINHEIRO,R.A.N. Eficiência de glyphosate no controle de *Commelina benghalensis* e *Commelina diffusa*. **Planta Daninha**, v.19,n.1,p.135-143,2001.
- SATICHIVI, N. M.; WAX, L. M.; STOLLER, E. W.; BRISKIN, D. P. Absorption and translocation of glyphosate isopropylamine and trimethylsulfonium salts in *Abutilon theophrasti* and *Setaria faberi*. **Weed Science**, v.48, p. 675-679, 2000.

- SCHULTZ, M.E.; BURNSIDE, O.C. Absorption, translocation and metabolism of 2,4-D and glyphosate in hemp dogbane (*Apocynum cannabinum*). **Weed Science**, v. 28, p.13-20, 1980.
- SELLECK, G.W.; BAIRD, D.D. Antagonism with glyphosate and residual herbicide combinations. **Weed Science**, v. 29, p.185-190, 1981.
- SPRANKLE, P.; MEGGIT, W.F.; PENNER, D. Absorption, action and translocation of glyphosate. **Weed Science**, v.26, p. 673-676, 1975.
- SPRANKLE, P.; SANDBERG, C. L.; MEGGITT, W. F.; PENNER, D. Separation of glyphosate and possible metabolites by thin layer chromatography. **Weed Science**, v. 26, p. 673-675, 1978.
- STARKE, R.J.; OLIVER, L.R. Interaction of glyphosate with chlorimuron, fomesafen, imazethapyr and sulfentrazone. **Weed Science**, v. 46, p.652-660, 1998.
- TAYLOR, S.E. Effect of rate and application timing of glyphosate to control sickle pod and other problem weeds of the Mississippi Delta. Arkansas, 1996. 116p. Thesis - (Ph.D.)- University of Arkansas.
- THOMPSON, K.; GRIME, J.P. Seasonal variation in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. **Journal of Ecology**, v. 67, p. 893-921, 1979.
- UOTILA, M.G.; GULLNER, G.; KOMIVES, T. Induction of glutathione S transferase activity and glutathione level in plants exposed to glyphosate. **Physiologia Plantarum**, v.93, p. 689-694, 1995.

- WANAMARTA, G. D.; PENNER, D. Foliar absorption of herbicides. **Weed Science**, v.4, p. 215-231, 1989.
- WELLS, B.H.; APPLEBY, A.P. Lactofen increases glyphosate stimulate shikimate production in little mallow (*Malva parviflora*). **Weed Science**, v. 40, p. 171-173, 1992.
- WESTWOOD, J.H.; YERKES, C. N.; DEGENNARO, F. P.; WELLER, S. C. Absorption and translocation of glyphosate in tolerant and susceptible biotypes of field bindweed (*Convolvulus arvensis*). **Weed Science**, v. 45, p. 658-663, 1997.
- WILLS, G. D. Factors affecting toxicity and translocation of glyphosate in cotton. **Weed Science**, v.26, p. 509-513, 1978
- WILSON, R.G. Biology of weed seed in the soil. In: ALTIERI, M.L.; LIEBMAN, M. (Ed.). **Weed management in agroecosystem: ecological approaches**. Boca Raton: CRS Press, 1988. p. 25-39.
- WYRILL, J.B. III.; BURNSIDE, O.C. Absorption, translocation and metabolism of 2,4 D and glyphosate in common milkweed and hemp dogbane. **Weed Science**, v. 24, p.557-566, 1976.
- YENISH, J.P.; DOLL, J.D.; BUHLER, D.D. Effects of tillage on vertical distribution and viability of weed seed in soil. **Weed Science**, v. 40, p. 429-433, 1992.