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

Identificação de *Amaranthus palmeri*, caracterização da resistência múltipla aos herbicidas inibidores da ALS e da EPSPS e controle químico baseado no uso das novas tecnologias transgênicas

Ednaldo Alexandre Borgato

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

**Piracicaba
2018**

Ednaldo Alexandre Borgato
Engenheiro agrônomo

Identificação de *Amaranthus palmeri*, caracterização da resistência múltipla aos herbicidas inibidores da ALS e da EPSPS e controle químico baseado no uso das novas tecnologias transgênicas

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

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

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Borgato, Ednaldo Alexandre

Identificação de *Amaranthus palmeri*, caracterização da resistência múltipla a herbicidas inibidores da ALS e da EPSPS e controle químico baseado no uso das novas tecnologias transgênicas / Ednaldo Alexandre Borgato. - - Piracicaba, 2018.

95 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Caruru 2. Mutação 3. Amplificação gênica 4. Culturas geneticamente modificadas I. Título

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Angela Fátima. dos Santos, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me abençoar, iluminar e guiar o meu caminho.

À minha mãe, Angela, e irmãos, Edjane, Edmara e Edvan, pelo apoio, amor e carinho.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos. Ao Programa de Excelência Acadêmica da CAPES (PROEX – CAPES) pelo oferecimento de verba destinada à compra de material para realização das pesquisas.

Ao Professor Dr. Pedro Jacob Christoffoleti pela oportunidade de orientação.

Ao Prof. Dr. Jason K. Norsworthy da University of Arkansas pela oportunidade de realização de estágio de mestrado em seu programa de pesquisa e pela disponibilização de recursos para execução de experimentos.

Aos Professores Dr. Todd A. Gaines e Dr. Scott J. Nissen e aos acadêmicos Anita Küepper e Eric L. Patterson, do Laboratório de Plantas daninhas da Colorado State University, pela condução dos experimentos de biologia molecular.

À Luciane Aparecida L. Toledo por todo auxílio sempre que necessário.

À Maria Letícia M. Zaccaro pela amizade e por toda a ajuda nos experimentos durante meu período no Arkansas. E também aos brasileiros que conheci em Fayetteville por toda ajuda e amizade: Ana Cláudia Langaro, Gerson Drescher, Tiago Kaspary, Marlon Bastiani e Samantha Segalin.

Aos Engenheiros Agrônomos MSc. Caio Augusto C. G. Brunharo e Dr. Marcel S. C. de Melo pela amizade e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Saul J. P. de Carvalho, ao Dr. Marcelo Nicolai e ao Eng. Agr. Acácio G. Netto pelos auxílios oferecidos, conhecimentos compartilhados, contribuições para o meu trabalho e amizade.

Ao Eng. Agr. Everton S. T. Barbosa pela amizade e companheirismo.

À Gloriosa República Gato Preto pelos anos vividos, aprendizado, amizade e companheirismo.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
Referências Bibliográficas.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
Referências Bibliográficas.....	20
3. CARACTERIZAÇÃO DE <i>Amaranthus palmeri</i> BASEADA NO MÉTODO DE GENOTIPAGEM DA KASP (<i>KOMPETITIVE ALLELE SPECIFIC PCR</i>).....	25
Resumo	25
Absract.....	25
3.1 Introdução.....	26
3.2 Material e Métodos	28
3.3 Resultados e Discussão.....	30
3.4 Conclusões.....	31
Referências Bibliográficas.....	32
4. CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE <i>Amaranthus palmeri</i> AOS HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS	35
Resumo	35
Abstract.....	35
4.1 Introdução.....	36
4.2 Material e Métodos	40
4.3 Resultados e Discussão.....	41
4.4 Conclusões.....	46
Referências Bibliográficas.....	47
5. CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE <i>Amaranthus palmeri</i> AO HERBICIDA GLYPHOSATE.....	53
Resumo	53
Abstract.....	53
5.1 Introdução.....	54
5.2 Material e Métodos	59
5.3 Resultados e Discussão.....	61
5.4 Conclusões.....	68

Referências Bibliográficas	68
6. CONTROLE QUÍMICO DE <i>Amaranthus palmeri</i> BASEADO NO USO DAS CULTURAS GENETICAMENTE MODIFICADAS COM NOVOS <i>TRAITS</i> DE TOLERÂNCIA A HERBICIDAS.....	77
Resumo	77
Abstract	77
6.1 Introdução	78
6.2 Material e Métodos	81
6.3 Resultados e Discussão	84
6.4 Conclusões	87
Referências Bibliográficas	88
7. CONCLUSÕES GERAIS	94

RESUMO

Identificação de *Amaranthus palmeri*, caracterização da resistência múltipla aos herbicidas inibidores da ALS e da EPSPS e controle químico baseado no uso das novas tecnologias transgênicas

A planta daninha *Amaranthus palmeri* é nativa dos Estados Unidos, porém foi pela primeira vez relatada no Brasil no ano de 2015. Embora comprovadamente com resistência múltipla aos herbicidas inibidores da ALS e da EPSPS, até o momento não foram investigadas as bases moleculares da resistência. Além disso, por causa da recente introdução da planta daninha no país, alternativas de manejo com culturas tolerantes a herbicidas necessitam ser estudadas. Sendo assim, os objetivos desse trabalho são de caracterizar a espécie de planta daninha introduzida no país, identificar os mecanismos de resistência aos herbicidas inibidores da ALS e da EPSPS presentes no biótipo, e propor abordagens de manejo em ambientes dos novos eventos transgênicos resistentes a herbicidas. Um bioensaio utilizando marcadores genéticos foi desenvolvido para confirmar que a população coletada no estado do Mato Grosso (BR-R) é *A. palmeri*, e não *A. tuberculatus*, outra espécie dióica do gênero *Amaranthus*. Os resultados de experimentos de curvas de dose-resposta e acúmulo de chiquimato indicaram que a BR-R possui alto nível de resistência, com DL_{50} de 4.426 e 3.400 g glyphosate ha^{-1} no primeiro e segundo experimento, respectivamente, mais que o dobro da dose tipicamente recomendada para o controle da espécie e, adicionalmente, observou se acúmulo mínimo de chiquimato a concentração de 1 mM nos tecidos das plantas tratadas com o herbicida. BR-R também foi resistente a herbicidas dos grupos químicos das sulfoniluréias e imidazolinonas. O mecanismo de resistência ao glyphosate encontrado nesta população foi a super expressão gênica, através do aumento no número de cópias do gene da EPSPS no genoma da planta BR-R, entre 50 e 179 cópias adicionais. Além disso, duas substituições de aminoácidos foram observadas na sequência da ALS, W574L e S653N, conferindo resistência tanto a sulfoniluréias quanto a imidazolinonas. No experimento utilizando os herbicidas correspondentes às culturas geneticamente modificadas com novos *traits* de tolerância a herbicidas observou se, de uma forma geral, que as associações de herbicidas apresentaram níveis de controle mais satisfatórios. Assim, esta pesquisa confirma a introdução de da espécie *A. palmeri* no Brasil, assim como a resistência múltipla aos herbicidas inibidores da EPSPS e da ALS. Seu manejo é mais eficaz através da associação de herbicidas, garantindo assim o uso racional das novas tecnologias de culturas geneticamente modificadas com tolerância a herbicidas.

Palavras-chave: Caruru; Mutação; Amplificação gênica; Culturas geneticamente modificadas

ABSTRACT

Identification of *Amaranthus palmeri*, characterization of multiple-resistance to ALS and EPSPS inhibitors herbicides and chemical control based on the use of genetically modified herbicide-tolerant crops technologies

Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*) is a weed species native to the United States, but it was reported in Brazil for the first time in 2015. Despite this population being resistant to EPSPS and ALS inhibitors, the molecular basis of its multiple resistance is unknown up to date. Because of this species introduction to Brazil, alternatives of management with the new herbicide-tolerant crops technologies need to be studied. The objectives of this research are to characterize the weed species introduced to Brazil, identify the mechanisms conferring resistance to ALS and EPSPS inhibitors herbicides, and to propose management approaches in environments with the new genetically modified herbicide-tolerant crops. A genotyping bioassay using genetic markers was developed to confirm that the species collected in the state of Mato Grosso (BR-R) is indeed *A. palmeri* and not *A. tuberculatus*, another dioecious species in the *Amaranthus* genus. Dose-response experiments and shikimate accumulation bioassay data indicate high level of resistance, with LD₅₀ of 4,426 and 3,400 g glyphosate ha⁻¹ in the first and second experiments, respectively, higher than the double rate typically recommended to control it, and minimal accumulation in BR-R with 1 mM of glyphosate in treated plants in the leaf disks assay. BR-R also was resistant to sulfonilurea and imidazolinone herbicides. The mechanism conferring resistance to glyphosate identified in this population was gene amplification, with increased EPSPS copy number - between 50 and 179 more copies in BR-R. Besides, two target-site mutations were identified in the ALS gene sequencing, W574L and S653N, conferring resistance to sulfonilureas and imidazolinones. The weed control experiment, overall, herbicide tank mixtures achieved higher levels of control. Therefore, this research confirms the introduction of *A. palmeri* to Brazil, as well as its multiple resistance to EPSPS and ALS inhibitor herbicides. Its control is more efficient with herbicide mixtures, which guarantees more sustainable use of the new herbicide-tolerant crop technologies.

Keywords: Pigweed; Target-site mutation; Gene amplification; Genetically modified crops

1. INTRODUÇÃO

O *Amaranthus palmeri*, espécie de planta daninha nativa dos Estados Unidos, foi relatada pela primeira vez no Brasil em áreas de produção de algodão e soja no estado do Mato Grosso (ANDRADE JR. et al., 2015). Possui elevado potencial de reprodução, disseminação, agressividade com as culturas agrícolas e dificuldade de controle devido às suas principais características biológicas (WARD et al., 2013). É uma das espécies mais problemáticas nos Estados Unidos, principalmente em áreas de produção de soja e algodão, localizadas na região sul do país, onde está amplamente difundida, devido ao potencial competitivo com as culturas, dificuldade de controle, e resistência ao glyphosate e outros herbicidas de diferentes mecanismos de ação herbicida (WARD et al., 2013).

As plantas daninhas são conhecidas por resultar em perdas de produtividade quando em convivência com as culturas devido à competição por recursos do meio, como água, nutrientes e luz. As perdas de produção por interferência do *A. palmeri* nas culturas agrícolas podem atingir índices de 79% para a cultura da soja, 65% para o algodão e 91% para o milho (ROWLAND et al., 1999; MASSINGA et al., 2001; BENSCH et al., 2003). Outro dano causado por essa espécie, quando presente no processo de colheita, principalmente em campos de produção de sementes das culturas, sendo que esta infestação pode ser decorrente de falhas de controle durante o ciclo da cultura ou, ainda mais problemático, decorrente da presença de indivíduos resistentes a herbicidas e que sobreviveram às pulverizações, sendo, portanto, uma espécie que merece devida atenção.

A identificação correta da espécie é fator determinante na abordagem de manejo de plantas daninhas, visto que é a flora infestante que vai definir a escolha dos herbicidas que podem ser utilizados para o controle. O *A. palmeri* pode ser considerado uma espécie de fácil identificação dentro do gênero *Amaranthus*, considerando as de maior importância agrícola, devido à presença de plantas dioicas e outras características morfológicas (WARD et al., 2013). No entanto, devido a plasticidade fenotípica, ou até mesmo da possibilidade de hibridação com outras espécies, há necessidade muitas vezes de, além do método visual, utilizar características morfológicas da planta, de usar outros métodos de identificação complementares de identificação (GAINES et al., 2012; NANDULA et al., 2014; MOLIN e NANDULA, 2017).

A utilização de herbicidas de um mesmo mecanismo de ação repetitivamente em uma área pode resultar na seleção de biótipos de plantas daninhas resistentes. Atualmente, biótipos de *A. palmeri* com resistência a diversos mecanismos de ação já foram identificados

no continente americano (HEAP, 2017). Essa é uma das características que atribui grande importância à espécie nos Estados Unidos, possuindo relatos de resistência a herbicidas pertencentes aos inibidores da ALS, FSII, PPO, HPPD, EPSPS e da tubilina (HEAP, 2017). Na Argentina, o *A. palmeri* possui resistência a ALS e EPSPS (BERGER et al., 2016), e vem se destacando como planta daninha de grande importância, por estar difundida e estabelecida em diversas regiões (MORICHETTI et al., 2013). Até sua recente introdução, o *A. palmeri* era desconhecido no Brasil.

A resistência a herbicidas pode ser amplamente organizada em duas categorias. Pode ser relacionada ao sítio de ação – *target-site resistance* (TSR) ou não relacionados ao sítio de ação – *non-target resistance* (NTSR) (TRANIEL e WRIGHT, 2002; DÉLYE, 2005; GAINES et al., 2010; POWLES e YU, 2010). Os mecanismos envolvidos basicamente são caracterizados por substituições na sequência de aminoácidos que afetam a interação do herbicida com a enzima alvo ou a amplificação gênica (TSR), absorção, translocação ou metabolismo diferencial, além do sequestro vacuolar (NTSR) (POWLES e YU, 2010; BECKIE e TARDIF, 2012).

De acordo com Merotto Jr. et al. (2010), conhecer os mecanismos de resistência presentes auxiliam na adoção de práticas de manejo mais adequadas, uma vez que é possível saber como ocorre a evolução da resistência. Estudos já realizados confirmaram que o biótipo encontrado no Brasil possui resistência ao glyphosate e herbicidas inibidores da ALS (CARVALHO et al., 2015; GONÇALVES NETTO et al., 2016), porém, ainda se desconhece os mecanismos envolvidos com esse biótipo.

A resistência inviabiliza a utilização de moléculas herbicidas, uma vez que os biótipos possuem capacidade de sobreviver às doses recomendadas, sendo necessárias mudanças nas práticas de manejo (CHRISTOFFOLETI et al., 2016) e, conseqüentemente, conhecer herbicidas alternativos. Herbicidas alternativos são os que possuem eficácia de controle sobre os biótipos resistentes (WALSH e POWLES, 2007). Nos últimos anos, praticamente não houve descoberta de novas moléculas herbicidas. No entanto, culturas geneticamente modificadas com novos *traits* de tolerância a novos herbicidas poderão ser utilizadas como alternativas para o manejo de plantas daninhas de difícil controle e de populações resistentes.

O presente trabalho de pesquisa foi desenvolvido com o objetivo de confirmar, através de métodos de biologia molecular, se a espécie de *Amaranthus* recém introduzida no Brasil é *A. palmeri*, identificar os mecanismos presentes no biótipo conferindo resistência ao

glyphosate e inibidores da ALS, e avaliar a eficácia de tratamentos herbicidas no controle da espécie.

Referências bibliográficas

ANDRADE JR., E.R.; CAVENAGHI, A.L.; GUIMARÃES, S.C.; CARVALHO, S.J.P. **Primeiro relato de *Amaranthus palmeri* no Brasil em áreas agrícolas no estado de Mato Grosso**. Circular técnica – IMAmt. n. 19, 2015. Disponível em: <http://www.imamt.com.br/system/anexos/arquivos/294/original/circular_tecnica_edicao19_bx_ok.pdf?1434631723> Acesso em: 01/12/2017.

BECKIE, H. J.; TARDIF, F.J. Herbicide cross resistance in weeds. **Crop Protection**, v. 35, p. 15-28, 2012.

BENSCH, C.N.; HORAK, M.J.; PETERSON, D. Interference of redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*), Palmer amaranth (*A. palmeri*), and common waterhemp (*A. rudis*) in soybean. **Weed Science**, v. 51, n. 1, p. 37-43, 2003.

BERGER, S.; MADEIRA, P.T.; FERREL, J.; GETTYS, L.; MORICHETTI, S.; CANTERO, J.J.; NUÑEZ, C. Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*) identification and documentation of ALS-resistance in Argentina. **Weed Science**, v. 64, p 312-320, 2016.

CARVALHO, S.J.P.; GONÇALVES NETTO, A.; NICOLAI, M.; CAVENAGHI, A.L.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Detection of glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) in agricultural areas of Mato Grosso, Brazil. **Planta Daninha**, v. 33, p. 579-586, 2015.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; NICOLAI, M.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; BORGATO, E.A.; GONÇALVES NETTO, A.; MELO, M.S.C. Resistência de Plantas daninhas a herbicidas: termos e definições importantes. In: CHRISTOFFOLETI, P.J.; NICOLAI, M. (Eds.) **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 4ª Edição. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), 2016, 262 p.

DÉLYE, C. Weed resistance to acetyl-coenzyme-A carboxylase inhibitors: an update. **Weed Science**, v. 53, p. 728-746, 2005.

GAINES T.A.; ZHANG, W.; WANG, D.; BUKUN, B.; CHISHOLM, S.T.; SHANER, D.L.; NISSEN, S.J.; PATZOLDT, W.L.; TRANEL, P.J.; CULPEPPER, A.S.; GREY, T.L.; WEBSTER, T.M.; VENCILL, W.K.; SAMMONS, R.D.; JIANG, J.M.; PRESTON, C.; LEACH, J.E.; WESTRA, P. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 107, p. 1029-1034, 2010.

GAINES, T. A.; WARD, S.M.; BEKUN, B.; PRESTON, C.; LEACH, J.E., WESTRA, P. Interspecific hybridization transfers a previously unknown glyphosate resistance mechanism in *Amaranthus* species. **Evolutionary Applications**, v. 5, p. 29-38, 2012.

GONÇALVES NETTO, A.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S.J.P.; BORGATO, E.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Multiple resistance of *Amaranthus palmeri* to ALS and EPSPS inhibiting herbicides in the state of Mato Grosso, Brazil. **Planta Daninha**, v. 34, p. 581-587, 2016.

HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. Disponível em: www.weedscience.org. Acesso em: 01/12/2017.

MASSINGA, R. A.; CURRIE, R.S.; HORAK, M.J.; BOYER, J. Interference of Palmer amaranth in corn. **Weed Science**, v. 49, p. 202-208, 2001.

MEROTTO JR., A.; KUPAS, V.R.; NUNES, A.L.; GOULART, I.C.G.R. Isolamento do gene ALS e investigação do mecanismo de resistência a herbicidas em *Sagittaria montevidensis*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 11, p. 2381-2384, 2010.

MOLIN, W.T.; NANDULA, V.K. Morphological characterization of *Amranthus palmeri* x *A. spinosus* hybrids. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, p. 1499-1510, 2017.

MORICHETTI, S.; CANTERO, J.J.; NUÑEZ, C.; BARBOZA, G.; ARIZA ESPINAR, L.; AMUCHASTEGUI, A.; FERREL, J. Sobre la presencia de *Amaranthus palmeri* (Amaranthaceae) en Argentina. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 48, n. 2, 2013.

NANDULA, V.K.; WRIGHT, A.A.; BOND, J.A.; RAY, J.D.; EUBANK, T.W.; MOLIN, W.T. EPSPS amplification in glyphosate-resistant spiny amaranth (*Amaranthus spinosus*): a case of gene transfer via interspecific hybridization from glyphosate-resistant Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*). **Pest Management Science**, v. 70, p. 1902-1909, 2014.

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

ROWLAND, M.W.; MURRAY, D.S.; VERHALEN, L.M. Full-season Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) interference with cotton (*Gossypium hirsutum*). **Weed Science**, v. 47, p. 305-309, 1999.

TRANEL, P.J.; WRIGHT, T.R. Resistance of weeds to ALS inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, v. 50, p. 700-712, 2002.

WALSH, M.J.; POWLES, S.B. Management strategies for herbicide-resistant weed population in Australian dryland crop production systems. **Weed Technology**, v. 21, p. 332-338, 2007.

WARD, S.; WEBSTER, T.M.; STECKEL, L.E. Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*): A review. **Weed Technology**, v. 27, p. 12-27, 2013.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O *Amaranthus palmeri* é uma espécie de planta daninha recém introduzida em sistemas agrícolas no Brasil (ANDRADE JR. et al., 2015; CARVALHO et al., 2015). É uma planta nativa de regiões desérticas localizadas entre o sul da Califórnia, Novo México e Texas, e noroeste do México (SAUER, 1957). Foi introduzido ao sistema agrícola americano como invasora através da atividade humana e se estabeleceu devido à sua elevada capacidade de sobrevivência a condições extremas de umidade e temperaturas (SAUER, 1957; MOERMAN, 1998; WARD et al. 2013). Atualmente, é uma das espécies mais problemáticas principalmente em áreas de produção de soja e algodão localizadas na região sul dos Estados Unidos e é considerada uma das espécies resistentes ao glyphosate de maior potencial de dano econômico (BECKIE, 2006; WEBSTER e NICHOLS, 2012).

Até a introdução do *A. palmeri* no Brasil, cerca de outras 10 espécies de caruru eram as de maior importância agrônômica (KISSMAN e GROTH, 1999), com destaque para *A. deflexus*, *A. hybridus*, *A. retroflexus*, *A. spinosus*, *A. viridis* (CARVALHO et al., 2008). As espécies do gênero *Amaranthus* são plantas dicotiledôneas de ciclo fotossintético C4. As características que diferenciam o *A. palmeri* das principais espécies de caruru já presentes na agricultura brasileira são a presença de pecíolo com comprimento maior que o do limbo foliar, a presença de estruturas espinescentes nas gemas axilares, e a dioicia, ou seja, a existência de plantas masculinas e femininas separadas, sendo esta a característica mais evidente (STECKEL, 2007; WARD et al., 2013).

A identificação correta da espécie de planta daninha é de fundamental importância para a decisão das práticas de manejo a serem adotadas. Isso porque cada espécie pode ter um determinado comportamento biológico, no que diz respeito ao período de maior fluxo de emergência, crescimento e desenvolvimento mais intensos, além do potencial de dano com cada cultura. Além disso, é o conhecimento da comunidade infestante que vai direcionar as práticas de manejo desde o período de pré-plantio até a pós-colheita, além da entressafra.

O termo “planta daninha” possui diversas definições, mas para a atividade agrícola esse caráter é atribuído de acordo com a indesejabilidade da espécie em determinado meio, interferindo com os objetivos do homem (SILVA et al., 2007). Na agricultura, causam danos diretos pela competição por recursos do meio, como água, nutrientes e luz, reduzindo a produtividade das culturas, podendo atingir níveis de 53% a 100% de perdas de produção (BLANCO et al., 1976; CARVALHO, 1993). Outros exemplos de danos conhecidos como indiretos são caracterizados, por exemplo, pela redução da qualidade de sementes em pós-

colheita, dificuldade da colheita em cana-de-açúcar, hospedeiras de pragas e doenças ou atuando como agente alelopático (MULLER, 1966; PROCÓPIO et al., 2003). Portanto, sendo indivíduos que necessitam ser controlados.

Segundo Massinga et al. (2001), o *A. palmeri* causa perdas de produtividade no milho da ordem de 11% em densidade de apenas 0,66 plantas m⁻², podendo chegar a 91% à densidade de 10 plantas m⁻², quando emergem com a cultura. Mesmo quando emergem entre V4 e V7, as perdas de produtividades podem chegar a 35%. Na cultura do algodão, os danos podem chegar a 11% à densidade de 0,11 plantas m⁻² e até 59% a 1,1 plantas m⁻² (ROWLAND et al., 1999; MORGAN et al., 2001). Em competição com a soja, as perdas podem atingir de 17% a 0,33 pl m⁻², 64% a 3,33 pl m⁻², 79% a 10 pl m⁻², indicando que a infestação em baixas densidades resulta em danos parecidos com os causados por infestações em altas densidades (KLINGAMAN e OLIVER, 1994; BENSCH et al., 2003).

Além do elevado potencial de competição, o *A. palmeri* produz elevado número de sementes. Keeley et al. (1987) relatam a produção de 200 a 600 mil sementes por planta na ausência de competição. Essa característica possibilita o rápido estabelecimento dessa planta daninha em casos de ineficácia das práticas de controle. Outro ponto a ser considerado é a rápida taxa de fecundação (WARD et al., 2013), ou seja, a produção de sementes férteis e viáveis em curto período após emergência, sendo o ciclo da espécie de aproximadamente 150 dias. Além disso, as sementes do *A. palmeri* são predominantemente dispersas por gravidade, porém podem também se dispersar através de água de irrigação, pássaros e mamíferos, e das práticas agrícolas, como uso de arado e gradagem (COSTEA et al., 2004; COSTEA et al., 2005; NORSWORTHY et al., 2009). Por essas razões, o *A. palmeri* possui elevada habilidade de incremento do banco de sementes e transporte, o que viabiliza sua dispersão e seu rápido estabelecimento.

Outras características contribuem com a adaptabilidade do *A. palmeri*. Além de ser uma planta dicotiledônea e de ciclo fotossintético C4, essa espécie se tornou uma das plantas daninhas mais problemáticas nos Estados Unidos devido a sua habilidade de evolução e surgimento de biótipos resistentes a herbicidas (WEBSTER e NICHOLS, 2012). Como planta alógama, devido à presença das estruturas florais masculinas e femininas em plantas separadas, a polinização cruzada garante diversidade genética da espécie (FRANSSEN et al., 2001; WARD et al., 2013). Além disso, Sosnoskie et al. (2012) relataram o transporte de pólen por mais de 300 metros de plantas masculinas resistentes a glyphosate a plantas femininas suscetíveis. A dioícia também contribui com o sucesso adaptativo da espécie, uma

vez que facilita o transporte dos genes de resistência através dos grãos-de-pólen (WARD et al., 2013).

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é definida como a capacidade natural e herdável que alguns biótipos possuem de sobreviver a doses de um herbicida que seria letal ao biótipo suscetível (selvagem) (CHRISTOFFOLETI e LÓPEZ-OVEJERO, 2008; CHRISTOFFOLETI et al., 2016). Ocorre devido à utilização repetitiva de um mesmo mecanismo de ação ao longo dos anos, que seleciona indivíduos capazes de sobreviver à ação do herbicida. Os indivíduos resistentes, então, se reproduzem e aumentam em número na próxima geração, e assim consecutivamente até se tornarem predominante dentre a população infestante presente na área.

Os biótipos resistentes possuem características genéticas ou processos fisiológicos diferenciados dos biótipos suscetíveis, que lhe atribuem a capacidade de sobrevivência, conhecidos como mecanismos de resistência. A resistência pode ser classificada, basicamente, em duas categorias. *Target-site resistance* (TSR), sendo decorrente da alteração no sítio de ação ou superexpressão enzimática, e *non-target-site resistance* (NTSR), processos que reduzem a quantidade de herbicida que atinge a enzima alvo. É importante ressaltar que a exposição ao herbicida não causa alterações nas plantas de forma que elas desenvolvam esses mecanismos, e sim os indivíduos que naturalmente já os possuem, por variabilidade genética que ocorre ao acaso, são selecionados após as pulverizações e aumentam em frequência nos ciclos seguintes (CHRISTOFFOLETI e LÓPEZ-OVEJERO, 2008).

A resistência específica, ou *target site resistance* (TSR), ocorre devido a alterações no local de ação do herbicida, normalmente na enzima alvo de inibição. Esse tipo de resistência pode acontecer devido a presença de mutações na sequência de aminoácidos que a constituem. Algumas mutações podem levar a alterações na conformidade da enzima, o que resulta na incapacidade do herbicida se ligar à mesma e exercer sua função de inibição (TRANSEL e WRIGHT, 2002; DÉLYE, 2005; POWLES e YU, 2010). Outro mecanismo de resistência por alterações no sítio de ação é a amplificação gênica, recentemente descoberto em espécies de plantas daninhas (GAINES et al., 2010; POWLES, 2010; POWLES e YU, 2010). Neste caso, o genoma da planta possui diversas cópias do gene que codifica a enzima em questão. Dessa forma, as plantas possuem diversas cópias da enzima e, mesmo quando exposta ao herbicida, a dose utilizada (recomendada) não é suficiente para inibir a atividade de todas essas cópias e causar a morte do vegetal (GAINES et al., 2010).

Outros mecanismos são relacionados como causas da resistência de plantas daninhas à herbicidas correspondem a processos físico-químicos ou metabólicos, tais como

mecanismos de absorção e translocação diferenciais, detoxificação, metabolismo, ou sequestro vacuolar (POWLES e YU, 2010; BECKIE e TARDIF, 2012). Biótipos de *Chloris polydactyla* e *Conyza canadensis* foram relatados no Brasil com menor absorção e translocação do herbicida (BRUNHARO et al., 2015; CARDINALI et al., 2015). Esses mecanismos fazem com que o herbicida tenha sua quantidade reduzida a uma dose não letal antes de atingir o alvo enzimático.

Diversos são os mecanismos de resistência e diversos são os casos relatados no mundo. Ainda, devido à diversidade genética, podem existir populações de uma mesma espécie com mecanismos de resistência distintos. Nesse sentido, biótipo de *Conyza canadensis* com rápido sequestro vacuolar de glyphosate foram reportados (GE et al., 2010). Outro exemplo pode ser ilustrado com biótipos de *Lolium multiflorum* com translocação reduzida do herbicida glyphosate relatado na Nova Zelândia (GHANIZADEH et al., 2016) e com amplificação do gene que codifica a EPSPS no estado do Arkansas, nos Estados Unidos (SALAS et al., 2012), mostrando a elevada capacidade de adaptação em diferentes populações.

Diversos fatores bioecológicos, agrônômicos e ambientais interagem com a seleção de biótipos que possuem os mecanismos de resistência (CHRISTOFFOLETI e LÓPEZ-OVEJERO, 2008). De acordo com esses autores, pode-se destacar o número de ciclos da espécie por ano, a taxa de reprodução, se a espécie é alógama ou autógama como fatores biológicos. Como fatores agrônômicos, efeito residual do herbicida, dose utilizada, frequência de aplicação, eficácia, e o sistema de produção. E como fatores genéticos, a frequência inicial de alelos resistentes, número de alelos resistentes, se a herança é nuclear ou maternal, dentre outros.

No Brasil, atualmente 28 espécies possuem resistência a herbicidas, sendo 19 espécies resistentes a inibidores da ALS e 8 a EPSPS (HEAP, 2017). Nos últimos anos, houve acentuado aumento no relato de novos casos de resistência, principalmente ao glyphosate (HEAP, 2017), devido à pouca diversificação das práticas de manejo em culturas resistentes ao herbicida e em sistemas conservacionistas. O uso repetitivo da mesma molécula durante os anos agrícolas aumenta a pressão de seleção, resultando na seleção de biótipos resistentes.

Nos Estados Unidos, o primeiro caso de *A. palmeri* resistente foi relatado no estado da Carolina do Sul, em 1989, resistente a trifluralina (HEAP, 2017). Atualmente, essa espécie possui resistência simples a diversos mecanismos de ação herbicidas, tais como inibidores da tubulina, FSII, ALS, EPSPS, HPPD, PPO, e múltipla a ALS+EPSPS, FSII+HPPD, PPO+EPSPS, ALS+FSII+EPSPS, ALS+PSII+HPPD (HEAP, 2017). Recentemente,

Schwartz-Lazaro et al. (2017) encontraram biótipos com resistência múltipla a EPSPS+ALS+PPO e possivelmente às dinitroanilinas no estado do Arkansas. O biótipo de *A. palmeri* recém introduzido no Brasil possui resistência cruzada aos herbicidas chlorimuron, imazethapyr e cloransulan, inibidores da ALS, além do glyphosate, inibidor da EPSPS (CARVALHO et al., 2015; GONÇALVES NETTO et al., 2016).

A ocorrência da resistência é uma ameaça aos sistemas de produção agrícolas. De acordo com Christoffoleti e López-Ovejero (2008), entre as principais consequências, pode-se enumerar a restrição ou inviabilidade da utilização de herbicidas importantes para certos sistemas de produção, perdas de áreas de plantio e perdas de rendimento e qualidade dos produtos agrícolas. Além disso, a presença de espécies resistentes faz com que sejam necessárias a adoção de estratégias de manejo de combate de maior sustentabilidade a médio e longo prazo. Essas medidas, no entanto, normalmente encarecem os custos, podendo chegar a níveis elevados para o produtor, pondo em risco a lucratividade.

Além da utilização de herbicidas, outras práticas de manejo podem ser utilizadas para retardar (prevenir) a seleção de biótipos resistentes. A exemplo de outras medidas para o manejo químico, pode-se citar a utilização de herbicidas em associação, a utilização de herbicidas em pré e pós-emergentes, a utilização de aplicações sequenciais, a rotação de ingredientes ativos de diferentes mecanismos de ação. Como manejo cultural, a redução no espaçamento, o plantio de culturas em consórcio, a rotação de cultura, a utilização de cultura de cobertura na época de pousio e o plantio direto (BOERBOOM, 1999). No entanto, segundo Beckie (2006) o produtor tenta diversificar as práticas de manejo somente após detectar o problema da resistência.

Dessa forma, em cenários de utilização de culturas geneticamente modificadas com resistência à herbicidas, os produtores deixam de incorporar tais práticas ao sistema de manejo integrado, e se baseiam na utilização de herbicida. A exemplo, pode-se citar a utilização de culturas resistentes ao glyphosate. Após a comercialização dessas culturas, a plataforma de manejo foi simplificada, limitando-se unicamente à utilização desse herbicida ao longo das safras e os anos agrícolas. Essa prática resultou no aumento de casos de biótipos resistentes e na insustentabilidade desse sistema de manejo.

O presente trabalho tem como objetivos confirmar a espécie de *Amaranthus* introduzido no Brasil, a caracterização da resistência ao herbicida glyphosate bem como o mecanismo de resistência presente no biótipo, a caracterização do mecanismo de resistência a herbicidas inibidores da ALS, e avaliar a eficácia de controle de tratamentos herbicidas,

isolados e em potenciais misturas, utilizados em culturas geneticamente modificadas com novos *traits* de tolerância a herbicidas.

Referências bibliográficas

ANDRADE JR., E.R.; CAVENAGHI, A.L.; GUIMARÃES, S.C.; CARVALHO, S.J.P. **Primeiro relato de *Amaranthus palmeri* no Brasil em áreas agrícolas no estado de Mato Grosso**. Circular técnica – IMAmt. n. 19, 2015. Disponível em: <http://www.imamt.com.br/system/anexos/arquivos/294/original/circular_tecnica_edicao19_bx_ok.pdf?1434631723> Acesso em: 01 dez. 2017.

BECKIE, H. J. Herbicide resistant weeds: management tactics and practices. **Weed Technology**, v. 20, p. 793-814, 2006.

BECKIE, H. J.; TARDIF, F.J. Herbicide cross resistance in weeds. **Crop Protection**, v. 35, p. 15-28, 2012.

BENSCH, C.N.; HORAK, M.J.; PETERSON, D. Interference of redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*), Palmer amaranth (*A. palmeri*), and common waterhemp (*A. rudis*) in soybean. **Weed Science**, v. 51, n. 1, p. 37-43, 2003.

BLANCO, H.G.; ARAUJO, J.B.M; OLIVEIRA, D.A. Estudo sobre competição das plantas daninhas na cultura do milho (*Zea mays* L.). IV. Determinação do período de competição. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 43, p. 105-114, 1976.

BOERBOOM, C.M. Non-chemical options for delaying weed resistance to herbicides in Midwest cropping systems. **Weed Technology**, v.13, p. 636-642, 1999.

BRUNHARO, C.A.C.G.; PATTERSON, E.L.; CARRIJO, D.R.; MELO, M.S.C.; GAINES, T.A.; NISSEN, S.J.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Confirmation and mechanism of glyphosate resistance in tall windmill grass (*Chloris elata*) from Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, p. 1758-1764, 2016.

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

CARVALHO, S.J.P.; GONÇALVES NETTO, A.; NICOLAI, M.; CAVENAGHI, A.L.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Detection of glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) in agricultural areas of Mato Grosso, Brazil. **Planta Daninha**, v. 33, p. 579-586, 2015.

CARVALHO, S.J.P.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Crescimento e desenvolvimento de cinco espécies de plantas daninhas do gênero *Amaranthus*. **Bragantia**, v. 67, n. 2, p. 317-326, 2008.

CARVALHO, F.T. **Integração de práticas culturais e dosagens de herbicida aplicado em pós-emergência no controle de plantas daninhas e produtividade da cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill]**. 1993. 94p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 1993.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; NICOLAI, M.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; BORGATO, E.A.; GONÇALVES NETTO, A.; MELO, M.S.C. Resistência de Plantas daninhas a herbicidas: termos e definições importantes. In: CHRISTOFFOLETI, P.J.; NICOLAI, M. (Eds.) **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 4ª Edição. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), 2016, 262 p.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Resistência de Plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no Mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Ed.) **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3ª Edição. Campinas: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas Daninhas aos Herbicidas (HRAC-BR), 2008. 120p.

COSTEA, M.; WEAVER, S.E.; TARDIFF, F.J. The biology of Canadian weeds. 130. *Amaranthus retroflexus* L., *A. powellii* S. Watson and *A. hybridus* L. **Canadian Journal of Plant Sciences**, v. 84, p. 631-668, 2004.

COSTEA, M.; WEAVER, S.E.; TARDIFF, F.J. The biology of invasive alien plants in Canada. 3. *Amaranthus tuberculatus* (Moq.) Sauer var. *rudis* (Sauer) Costea & Tardif. **Canadian Journal of Plant Sciences**, v. 85, p. 507-522, 2005.

DÉLYE, C. Weed resistance to acetyl-coenzyme-A carboxylase inhibitors: an update. **Weed Science**, v. 53, p. 728-746, 2005.

FRANSSEN, A.S.; SKINNER, D.Z.; AL-KHATIB, K.; HORAK, M.J.; KULAKOW, P.A. Interspecific hybridization and gene flow of ALS resistance in *Amaranthus* species. **Weed Science**, v. 49, p. 598-606, 2001.

GAINES T.A.; ZHANG, W.; WANG, D.; BUKUN, B.; CHISHOLM, S.T.; SHANER, D.L.; NISSEN, S.J.; PATZOLDT, W.L.; TRANEL, P.J.; CULPEPPER, A.S.; GREY, T.L.; WEBSTER, T.M.; VENCILL, W.K.; SAMMONS, R.D.; JIANG, J.M.; PRESTON, C.; LEACH, J.E.; WESTRA, P. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 107, p. 1029-1034, 2010.

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

GHANIZADEH, H.; HARRINGTON, K.C.; JAMES, T.K.; WOOLEY, D.J.; ELLISON, N.W. Restricted herbicide translocation was found in two glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) populations from New Zealand. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 8, p. 1041-1051, 2016.

GONÇALVES NETTO, A.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S.J.P.; BORGATO, E.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Multiple resistance of *Amaranthus palmeri* to ALS and EPSPS inhibiting herbicides in the state of Mato Grosso, Brazil. **Planta Daninha**, v. 34, p. 581-587, 2016.

HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. Disponível em: www.weedscience.org. Acesso em: 01/12/2017.

KEELEY, P.E.; CARTER, C.H.; THULLEN, R.J. Influence of planting date on growth of Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). **Weed Science**, v. 35, p. 199-204, 1987.

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

KLINGAMAN, T.E.; OLIVER, L.R. Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) interference in soybeans (*Glycine max*). **Weed Science**, v. 42, p. 523-527, 1994.

MASSINGA, R.A.; CURRIE, R.S.; HORAK, M.J.; BOYER, J. Interference of Palmer amaranth in corn. **Weed Science**, v. 49, p. 202-208, 2001.

MOERMAN, D.E. **Native American Ethnobotany**. Portland, OR: Timber Press, 1998.

MORGAN, G.D.; BAUMANN, P.A.; CHANDLER, J.M. Competitive impact of Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) on cotton (*Gossypium hirsutum*) development and yield. **Weed Technology**, v. 15, p. 408-412, 2001.

MULLER, C.H. The role of chemical inhibition (allelopathy) in vegetation composition. **Bulletin of Torrey Botanical Club**, v. 93, n. 5, p. 332-351, 1966.

NORSWORTHY, J.K.; SMITH, K.L.; STECKEL, L.E.; KOGER, C.H. Weed seed contamination of cotton gin trash. **Weed Technology**, v. 23, p. 574-580, 2009.

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

POWLES, S.B. Gene amplification delivers glyphosate-resistant weed evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 107, p. 955-956, 2010.

PROCÓPIO, S.O.; SILVA, A.A.; VARGAS, L. Manejo e controle de plantas daninhas em cana-de-açúcar. In: VARGAS, L., ROMAN, E.S. (Eds.). **Manual de manejo e controle de plantas daninhas**. 2. ed. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. Cap. 15, p. 477-531.

ROWLAND, M.W.; MURRAY, D.S.; VERHALEN, L.M. Full-season Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) interference with cotton (*Gossypium hirsutum*). **Weed Science**, v. 47, p. 305-309, 1999.

SALAS, R.A.; DAYAN, F.E.; PAN, Z.; WATSON, S.B.; DICKSON, J.W.; SCOTT, R.C.; BURGOS, N.R. EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* spp. *multiflorum*) from Arkansas. **Pest Management Science**, v. 68, p. 1223-1230, 2012.

SAUER, J. Recent migration and evolution of the dioecious Amaranths. **Evolution**, v. 11, p. 11-31, 1957.

SCHWARTZ-LAZARO, L.M.; NORSWORTHY, J.K.; SCOTT, R.C.; BARBER, L.T. Resistance of two Arkansas Palmer amaranth populations to multiple herbicide sites of action. **Crop Protection**, v. 96, p. 158-163, 2017.

STECKEL, L.E. The dioecious *Amaranthus* spp.: here to stay. **Weed Technology**, v. 21, p. 567-570, 2007.

SILVA, A.A.; FERREIRA, A.F.; FERREIRA, L.R.; SANTOS, J.B. Biologia de plantas daninhas. In: SILVA, A.A., SILVA, J.F. (Eds.) **Tópicos em manejo de plantas daninhas**, Viçosa, MG: Ed. UFV, 2007, p. 1-62.

SOSNOSKIE, L.M.; WEBSTER, T.M.; KICHLER, J.M.; MACRAE, A.W.; GREY, T.L.; CULPEPPER, A.S. Pollen-mediated dispersal of glyphosate-resistance in Palmer amaranth under field conditions. **Weed Science**, v. 60, p. 366-373, 2012.

TRANEL, P.J.; WRIGHT, T.R. Resistance of weeds to ALS inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, v. 50, p. 700-712, 2002.

WARD, S.; WEBSTER, T.M.; STECKEL, L.E. Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*): A review. **Weed Technology**, v. 27, p. 12-27, 2013.

WEBSTER, T.M.; NICHOLS, R.L. Changes in the prevalence of weed species in the major agronomic crops of the Southern United States: 1994/1995 to 2008/2009. **Weed Science**, v. 60, p. 145-157, 2012.

3. CARACTERIZAÇÃO DE *Amaranthus palmeri* BASEADA NO MÉTODO DE GENOTIPAGEM DA KASP (*KOMPETITIVE ALLELE SPECIFIC PCR*)

Resumo

O *Amaranthus palmeri* foi pela primeira vez relatado no Brasil em 2015. Visualmente, a espécie pode ser facilmente diferenciada das demais espécies de caruru presentes no país por ser de reprodução dióica. No entanto, *A. tuberculatus* é outra espécie dióica, que poderia ter sido introduzida, além da possibilidade de hibridação com outras plantas do gênero. Assim, foi desenvolvido um experimento de genotipagem pelo método da KASP (*Kompetitive Allele Specific*) comparando-se o biótipo recém introduzido no Brasil com uma população conhecida de *A. palmeri* procedente do estado da Geórgia, EUA (GA-S), e também com *A. tuberculatus*, procedente do estado de Nebraska, EUA (NE). Foi genotipado o polimorfismo (SNP), localizado no par de bases (pb) de posição 678 na sequência codificante da ALS, conhecido por ser uma Timina (T) em *A. palmeri* e uma Citosina (C) em *A. tuberculatus*, e que tem sido utilizado para diferenciar ambas as espécies. A genotipagem contou com seis plantas como testemunha, sendo três GA-S e três NE, e seis indivíduos da população proveniente do Brasil (BR-R). Dois *primers forward* foram desenhados para amplificar o SNP678 de ambas as espécies, possuindo uma extensão no final 5' diferenciando com nucleotídeo marcado HEX ou FAM cada uma das espécies. O *primer reverse* foi o mesmo utilizado para ambas as espécies. Após a reação em cadeia da polimerase (PCR), as leituras foram feitas em ambos os canais HEX e FAM para cada um dos poços, e corrigidas em comparação com a obtida no controle (sem DNA molde). A fluorescência foi plotada em gráfico de dispersão e os dados obtidos com os indivíduos da população BR-R foram então comparados com os padrões conhecidos de *A. tuberculatus* e *A. palmeri*. Os dados agruparam claramente o biótipo recém introduzido no Brasil com GA-S, tratando-se, portanto, de *A. palmeri*.

Palavras-chave: *Amaranthus tuberculatus*; Identificação; SNP678

Absract

Palmer amaranth was first reported in Brazil in 2015. Visually, Palmer amaranth can be easily distinguished from the other pigweed species existing in Brazil because it is a dioecious species. However, waterhemp (*A. tuberculatus*) is another dioecious species that could be introduced, despite the possibility of hybridization with other *Amaranthus* species. A genotyping assay was performed by Kompetitive Allele Specific (KASP) method comparing the biotype recently introduced in Brazil (BR-R) to a known *A. palmeri* standard from Georgia (GA-S) and a known *A. tuberculatus* from Nebraska (NE), USA. A protocol was developed to genotype a single nucleotide polymorphism (SNP) at position 678 in the ALS gene sequence, once this snp has been utilized to genetically identify waterhemp and Palmer amaranth. The assay was performed using six control individuals, (three GA-S Palmer amaranth individuals, three Nebraska waterhemp individuals) and six untreated individuals from the BR-R population. Two forward primers were designed to amplify the SNP678 of both species but contained a stretch of nucleotide at its 5' end distinguishing between HEX and FAM for each species. a universal reverse primer was developed for PCR that was complementary in both *Amaranthus* species. An end point fluorescent read was taken in both the HEX and FAM fluorescent channels. HEX and FAM fluorescence were corrected by background fluorescence from a no-template control. Fluorescence was plotted in a 2D

scatterplot, so BR-R population individuals' data could be compared to known waterhemp and Palmer amaranth samples. BR-R individuals were clearly clustered with GA-S, therefore, indeed being *A. palmeri*.

Keywords: *Amaranthus tuberculatus*; Identification; SNP678

3.1 Introdução

O *Amaranthus palmeri*, planta nativa dos Estados Unidos, foi introduzido em no Brasil em áreas agrícolas no estado do Mato Grosso (ANDRADE JR. et al., 2015). É uma das espécies de planta daninha mais agressivas que ocorrem nos Estados Unidos, ocasionando elevados índices de perdas em produção por matocompetição, chegando a 79% na cultura da soja (BENSCH et al., 2003). Dado seu potencial de prejuízo econômico, dispersão, e problemática da resistência a herbicidas, saber identificar essa espécie apropriadamente é de fundamental importância para a adoção de práticas de manejo mais eficazes, e para o suporte do sistema de monitoramento que vem sendo executado.

A identificação correta da espécie é de fundamental importância para as estratégias de controle, uma vez que integrar conhecimentos da biologia das plantas daninhas às essas estratégias, visando reduzir o banco de sementes a longo prazo, é a base para um manejo promissor (BHOWMIK, 1997; WALSH e POWLES, 2007). Assim, conhecer os padrões de emergência, fenologia, fecundidade, propágulos de dispersão, sua dinâmica e persistência no banco de sementes possibilita direcionar uma melhor estratégia que atinge as fases do ciclo mais sensíveis ao manejo (NORSWORTHY et al., 2012). Os sistemas agrícolas normalmente possuem grande diversidade de plantas daninhas, podendo incluir espécies resistentes a herbicidas, sendo que um dos principais desafios para um manejo efetivo é integrar medidas de controle químicas a práticas mecânicas e culturais, reduzindo a pressão de seleção e a dispersão da resistência. O desenvolvimento dessas estratégias exige compreensão da biologia e ecologia das espécies e dos sistemas agrícolas em que ocorrem (MORTENSEN et al., 2000).

O gênero *Amaranthus* é bastante característico. Possui plantas normalmente eretas, de haste cilíndrica, com inflorescências terminais em formato de espigas ou panículas (MOSYAKIN e ROBERTSON, 2003). Porém, a identificação de espécies pode ser bastante complexa, exigindo detalhamento floral (SAUER, 1967). O subgênero *Acnida* compreende nove espécies dióicas, ou seja, que possuem plantas de sexo separados, ao qual o *A. palmeri* corresponde. Outra espécie que está presente nessa categoria é o *A. tuberculatus*, também

conhecida como *A. rudis*. Sauer (1967) especifica que híbridos dessas espécies são comuns, e que essa ocorrência pode ser subestimada devido à capacidade de ambas espécies diluírem as características intermediárias através do retrocruzamento, preservando as características de genótipo dominante. Alguns autores consideram que *A. rudis* e *A. tuberculatus* são uma só espécie (PRATT e CLARK, 2001), embora *A. tuberculatus* var. *rudis* possa ter maiores tendências como planta daninha que *A. tuberculatus* var. *tuberculatus*.

A. palmeri e *A. tuberculatus* ganharam bastante importância como plantas daninhas nos Estados Unidos devido a capacidade que têm de evoluir e surgirem biótipos resistentes a herbicidas (STECKEL, 2007; WARD et al., 2013). O sucesso adaptativo dessas espécies é atribuído à presença das estruturas florais femininas e masculinas em sexos separados, que resulta na polinização cruzada, aumentando a diversidade genética da espécie e também facilitando o transporte dos genes de resistência (FRANSSEN et al., 2001; WARD et al., 2013).

Morfologicamente, *A. palmeri* se diferencia de *A. tuberculatus* por possuir pecíolo de maior comprimento que a bainha foliar e a presença de estruturas espinescentes nas gemas axilares (SAUER, 1957). No entanto, a diversidade genética especialmente nas espécies dioicas de *Amaranthus* e a plasticidade fenotípica por vezes dificultam a sua identificação. Além disso, são diversos os relatos de híbridos entre espécies de *Amaranthus*, o que pode ser outro fator que dificulta a identificação dessas espécies (GAINES et al., 2012; NANDULA et al., 2014; MOLIN e NANDULA, 2017).

As técnicas moleculares avançaram significativamente nos últimos anos. Para identificação de espécies, um dos métodos utilizados é o da genotipagem de Alelo Específico Competitivo (*Kompetitive Allele Specific – KASP*). KASP é um método de genotipagem que utiliza as formas particulares de alelos específicos através da reação em cadeia da polimerase (PCR) combinado a inovador e uniforme sistema baseado na fluorescência para a identificação e medida de variação genética ocorrendo a nível de nucleotídeos para detectar polimorfismos (SNPs), inserções ou deleções (InDels) (HE et al., 2014).

A enzima acetolactato sintase (ALS) possui um SNP em seu gene que tem sido utilizado para diferenciar geneticamente algumas espécies de *Amaranthus*, sendo uma Citosina (C) em *A. tuberculatus* e Timina (T) em *A. palmeri* (TRANDEL et al., 2002).

Dessa forma, o presente estudo visa identificar através do método da KASP se a nova espécie de *Amaranthus* introduzida no Brasil é *A. palmeri* ou *A. tuberculatus* por meio da genotipagem do SNP678 na sequência da ALS de ambas as espécies.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Material vegetal

Três populações de *Amaranthus* foram utilizadas ao longo das pesquisas realizadas neste trabalho. O biótipo brasileiro foi coletado na cidade de Ipiranga do Norte, Mato Grosso (CARVALHO et al., 2015; GONÇALVES NETTO et al., 2016). Um biótipo de *Amaranthus palmeri* utilizado nos estudos, previamente identificado, foi originariamente coletado em 2004 na Ponder Farm Research Station pertencente à Universidade da Geórgia, em Worth County, Estados Unidos (CULPEPPER et al., 2006). Esse mesmo biótipo foi também utilizado nos estudos que envolvem resistência a herbicidas como padrão suscetível, e devido a baixa exposição à herbicidas desde então. Uma população de *A. tuberculatus*, coletada no estado do Nebraska, EUA, foi utilizada nesse estudo de identificação da espécie da população brasileira (BERNARDS et al., 2012). A espécie, procedência e siglas dos biótipos utilizados nos estudos encontram-se, resumidamente, dispostas na Tabela 1.

Tabela 3.1 – Espécie, procedência e identificação (sigla) de *Amaranthus palmeri* e *Amaranthus tuberculatus* utilizadas para confirmação da espécie.

Espécie	Procedência	Sigla
<i>Amaranthus palmeri</i>	Mato Grosso, Brasil	BR-R
<i>Amaranthus palmeri</i>	Geórgia, EUA	GA-S
<i>Amaranthus tuberculatus</i>	Nebraska, EUA	NE

3.2.2 Diagnóstico da espécie através do método de genotipagem da KASP

3.2.2.1 Extração de DNA

O biótipo de *A. tuberculatus* foi utilizado para comparação por ser outra espécie dióica presente no gênero *Amaranthus*, porém não conhecida como presente no Brasil. A enzima acetolactato sintase (ALS) possui um polimorfismo de único nucleotídeo (Single Nucleotide Polymorphism - SNP) em seu gene que tem sido utilizado para diferenciar geneticamente algumas espécies de *Amaranthus*, sendo uma Citosina (C) em *A. tuberculatus* e Timina (T) em *A. palmeri* (TRANSEL et al., 2002). Para determinar se a espécie recém introduzida no Brasil corresponde a *A. palmeri*, um protocolo de genotipagem foi desenvolvido baseado nesse SNP.

Para isso, aproximadamente 50 mg de tecido foliar jovem de três diferentes indivíduos de GA-S, seis de BR-R e três de NE foram utilizados para extração de DNA utilizando-se o protocolo modificado de extração com cetiltrimetilamonio (CTAB) (DOYLE, 1991). As amostras foram dispostas em tubos, ao qual uma esfera metálica foi adicionada, seguida de nitrogênio líquido. Os conteúdos foram macerados utilizando Qiagen TissueLyser II (Qiagen Inc., Valencia, CA 91355) por 1 min e 30 oscilações por segundo. O tecido precipitado foi incubado com 500 µl de solução tampão 2× CTAB com 4 µl de 2-mercaptoethanol a 50°C por 15 min.

A suspensão foi então encubada por 15 min com 500 µl de clorofórmio:álcool isoamil (24:1) com agitações suaves e, em seguida, centrifugada por 15 min a 15.000×giros (g). A fase aquosa foi removida e separada usando outros 500 µl de clorofórmio:álcool isoamil (24:1) e novamente centrifugada por 5 min a 15.000×g. A fase aquosa foi mais uma vez removida e precipitada com 50 µl de acetato de sódio (3M, pH 5.2) e 1650 µl de etanol 100%. Após 15 min em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 15.000×g por 15 min. Todo o líquido foi removido e os pellets foram enxaguados com etanol 70% e deixados para secar. Os pellets secos foram re-suspendidos em água. A concentração de DNA e a qualidade das amostras foram determinadas utilizando um micro-espectofotômetro (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE 19810).

3.2.2.2 Identificação de *Amaranthus palmeri* pelo método de genotipagem da KASP (*Kompetitive Allele Specific PCR*)

Para determinar se os indivíduos da população BR-R são *A. palmeri* ou *A. tuberculatus*, um experimento com a KASP foi desenvolvido para genotipar o SNP localizado no par de bases (pb) de posição 678 na sequência codificante da ALS (TRANDEL et al., 2002). O experimento foi conduzindo com seis plantas como testemunha, sendo três GA-S e três NE, e seis indivíduos da população BR-R. O SNP678 é conhecido como citosina (C) em *A. tuberculatus* e timina (T) em *A. palmeri*. Dois primers forward idênticos para o SNP678 foram desenvolvidos, exceto o nucleotídeo final 3', cujo par de base coincide com o snp678. Adicionalmente, cada primer forward contém uma extensão de nucleotídeos no final específico 5' para ambos HEX e FAM nucleotídeo marcado contido no LGC Genomics Master Mix (A. *tuberculatus* forward primer: 5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAAAAGAAAGCTTCCTTAACAATTCTAGGG-3'; A. *palmeri* forward primer: 5'-

GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAAAAAGAAAGCTTCCTTAACAATTCTAGGA-3').

Um primer reverse universal (5'-GTTGAGGTAAGTTCGATCCATTACTAAGC-3') foi desenvolvido para a PCR, que era complementar em ambas as espécies.

Os *primers forward* e *reverse* foram misturados de acordo com recomendações do fabricante e adicionados 18 µl do *primer forward* para *A. tuberculatus* à concentração de 12 µM, 18 µl do *primer forward* para *A. palmeri* a 12 µM, e 45 µl do primer universal a 30 µM. A mistura de *primers* foi trazida para 150 µl com 10 mM Tris-HCL, pH8.3. Uma mistura matriz foi então gerada de 11,8 µl do *primer mix* e 432 µl do LGC Genomics Master Mix. As reações finais foram misturadas em 96 poços, com placas opticamente limpos pela combinação de 4 µl de DNA de *Amaranthus* a 5 ng µl com 4 µl de LGC Genomics Master Mix com os primers. As PCRs foram realizadas em termociclador Biorad CFX Connect com o protocolo de ciclos a seguir: 94 °C por 15 min; seguido por 10 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 61 reduzindo para 55 °C por 60 segundos (0,6 touchdown per cycle); seguido por 26 ciclos de 94 °C por 20 segundos, e 55 °C por 60 segundos. As leituras foram obtidas após resfriamento da placa a 30°C por 30 segundos, e feita em ambos os canais HEX e FAM. A fluorescência HEX e FAM foram corrigidas em comparação com a obtida pelo controle (sem DNA molde). Os dados da leitura da fluorescência foram plotados em gráfico de dispersão 2D e os dados obtidos com os indivíduos da população BR-R foram então comparados com os padrões conhecidos de *A. tuberculatus* (NE) e *A. palmeri* (GA-S). As amostras de *A. tuberculatus* (*primers* padronizados com fluorescência FAM) foram esperadas que apresentassem alta intensidade fluorescente para FAM mas não para HEX, enquanto *A. palmeri* (*primers* padronizados com fluorescência HEX) eram esperados que tivessem alta intensidade fluorescente para HEX mas não FAM. O agrupamento dos dados do biótipo BR-R com intensidade de fluorescência FAM ou HEX indicará sua identidade como *A. palmeri* ou *A. tuberculatus*.

3.3 Resultados e discussão

A genotipagem utilizada para amplificar o SNP678 do gene da ALS, que distingue o *A. palmeri* de *A. tuberculatus*, agrupou claramente os indivíduos de BR-R com indivíduos GA-S (Figura 3.1) devido a alta intensidade de fluorescência HEX produzida pelo *primer forward* marcado como HEX para *A. palmeri*. Os indivíduos conhecidos como *A. tuberculatus* ficaram separados pelo alelo nessa posição, como mostrado pelo *primer forward*

específico para *A. tuberculatus* (FAM). Assim, a espécie dióica de *Amaranthus* coletada no estado do Mato Grosso, Brasil, é *A. palmeri* e não *A. tuberculatus*.

Figura 3.1 – Genotipagem do SNP 678 em amostras de *Amaranthus* e agrupamento dos dados de fluorescência HEX e FAM em gráfico de dispersão confirmam que a população recém introduzida no Brasil é de fato *A. palmeri*, comparando-se com populações conhecidas de *A. palmeri* (GA-S), *A. tuberculatus* (NE), e controle (sem DNA molde). Fort Collins, CO, 2018.

3.4 Conclusões

A PCR foi eficiente para amplificação das sequências da ALS conforme os *primers forward* e *reverse* utilizados para as três amostras, NE, GA-S e BR-R.

De acordo com os parâmetros HEX (*A. palmeri*) e FAM (*A. tuberculatus*), o biótipo brasileiro (BR-R) foi agrupado com GA-S. A nova espécie de *Amaranthus* introduzida no Brasil é portanto *A. palmeri*.

Os dados dessa pesquisa corroboram a identificação feita previamente por Carvalho et al. (2015) e Carvalho (2016).

Referências bibliográficas

- ANDRADE JR., E.R.; CAVENAGHI, A.L.; GUIMARÃES, S.C.; CARVALHO, S.J.P. **Primeiro relato de *Amaranthus palmeri* no Brasil em áreas agrícolas no estado de Mato Grosso**. Circular técnica – IMAmt. n. 19, 2015. Disponível em: <http://www.imamt.com.br/system/anexos/arquivos/294/original/circular_tecnica_edicao19_bx_ok.pdf?1434631723> Acesso em: 01 dez. 2017.
- BENSCH, C.N.; HORAK, M.J.; PETERSON, D. Interference of redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*), Palmer amaranth (*A. palmeri*), and common waterhemp (*A. rudis*) in soybean. **Weed Science**, v. 51, n. 1, p. 37-43, 2003.
- BERNARDS, M.L.; CRESPO, R.J.; KRUGER, G.R.; GAUSSOIN, R.; TRANEL, P.J. A waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) population resistant to 2,4-D. **Weed Science**, v. 60, p. 379–384, 2002.
- BHOWMIK, P.C. Weed biology: importance to weed management. **Weed Science**, v. 45, p. 349-356, 1997.
- CARVALHO, S.J.P. **Identificação de espécies de plantas daninhas do gênero *Amaranthus***. Comitê de Ação Contra a Resistência de Plantas Daninhas à Herbicidas (HRAC-BR), 2016.
- CARVALHO, S.J.P.; GONÇALVES NETTO, A.; NICOLAI, M.; CAVENAGHI, A.L.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Detection of glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) in agricultural areas of Mato Grosso, Brazil. **Planta Daninha**, v. 33, p. 579-586, 2015.
- CULPEPPER, A.S.; GREY, T.L.; VENCILL, W.K.; KICHLER, J.M.; WEBSTER, T.M.; BROWN, S.M.; YORK, A.C.; DAVIS, J.W.; HANNA, W.W. (2006) Glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) confirmed in Georgia. **Weed Science**, v. 54, p. 620-626, 2006.
- DOYLE, J. DNA protocols for plants – CTAB total DNA isolation. In: HEWITT, G.M.; JOHNSTON, A. (Eds). **Molecular Techniques in Taxonomy**. Berlin: Springer, p. 283-293, 1991.

FRANSSEN, A.S.; SKINNER, D.Z.; AL-KHATIB, K.; HORAK, M.J.; KULAKOW, P.A. Interspecific hybridization and gene flow of ALS resistance in *Amaranthus* species. **Weed Science**, v. 49, p. 598-606, 2001.

GAINES, T. A.; WARD, S.M.; BEKUN, B.; PRESTON, C.; LEACH, J.E., WESTRA, P. Interspecific hybridization transfers a previously unknown glyphosate resistance mechanism in *Amaranthus* species. **Evolutionary Applications**, v. 5, p. 29-38, 2012.

GONÇALVES NETTO, A.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S.J.P.; BORGATO, E.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Multiple resistance of *Amaranthus palmeri* to ALS and EPSPS inhibiting herbicides in the state of Mato Grosso, Brazil. **Planta Daninha**, v. 34, p. 581-587, 2016.

HE, C.; HOLME, J.; ANTHONY, J. SNP genotyping: the KASP assay. In: FLEURY, D.; WHITFORD, R. (Eds.) **Crop Breeding: methods and protocols**. Humana Press, p. 75-86, 2014.

MOLIN, W.T.; NANDULA, V.K. Morphological characterization of *Amaranthus palmeri* x *A. spinosus* hybrids. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, p. 1499-1510, 2017.

MORTENSEN, D.A.; BASTIAANS, L.; SATTIN, M. The role of ecology in the development of weed management systems: an outlook. **Weed Research**, v. 40, p. 49-62, 2000.

MOSYAKIN, S.L.; ROBERTSON, K.R. *Amaranthus*. In: **Flora of North America. North of Mexico**. (Eds.) Oxford University Press, v. 4, p. 410-435, 2003.

NANDULA, V.K.; WRIGHT, A.A.; BOND, J.A.; RAY, J.D.; EUBANK, T.W.; MOLIN, W.T. EPSPS amplification in glyphosate-resistant spiny amaranth (*Amaranthus spinosus*): a case of gene transfer via interspecific hybridization from glyphosate-resistant Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*). **Pest Management Science**, v. 70, p. 1902-1909, 2014.

NORSWORTHY, J.K.; WARD, S.M.; SHAW, D.R.; LLEWELLYN, R.S.; NICHOLS, R.L.; WEBSTER, T.M.; BRADLEY, K.W.; FRISVOLD, G.; POWLES, S.B.; BURGOS, N.R.; WITT, W.W.; BARRETT, M. Reducing the risks of herbicide resistance: best management practices and recommendations. **Weed Science**, v. 60, p. 31-62, 2012.

PRATT, D.B.; CLARK, L.G. *Amaranthus rudis* and *A. tuberculatus* – one species or two? *Journal of the Torrey Botanical Society*, v. 128, p. 282-296, 2001.

SAUER, J. Recent migration and evolution of the dioecious Amaranths. **Evolution**, v. 11, p. 11-31, 1957.

STECKEL, L.E. The dioecious *Amaranthus* spp.: here to stay. **Weed Technology**, v. 21, p. 567-570, 2007.

TRANEL, P.J.; WASSOM, J.J.; JESCHKE, M.R.; RAYBURN, A.L. Transmission of herbicide resistance from a monoecious to a dioecious weedy *Amaranthus* species. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, p. 674-679, 2002.

WALSH, M.J.; POWLES, S.B. Management strategies for herbicide-resistant weed population in Australian dryland crop production systems. **Weed Technology**, v. 21, p. 332-338, 2007.

WARD, S.; WEBSTER, T.M.; STECKEL, L.E. Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*): A review. **Weed Technology**, v. 27, p. 12-27, 2013.

4. CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE *Amaranthus palmeri* AOS HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS

Resumo

A resistência a herbicidas inibidores da ALS está amplamente difundida em populações de *Amaranthus palmeri* nos Estados Unidos. O biótipo introduzido no Brasil também possui resistência a esse grupo de herbicidas. Esta pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de caracterizar a resistência no biótipo brasileiro aos herbicidas inibidores da ALS. O primeiro experimento foi constituído da aplicação de 1X de chlorsulfuron (88 g i.a. ha⁻¹) e sulfometuron (315 g i.a. ha⁻¹) sobre 28 plantas de cada biótipo estudado, coletado no Mato Grosso (BR-R) e padrão suscetível proveniente da Geórgia (GA-S). O segundo experimento foi baseado na aplicação de 1X do herbicida imazethapyr (61 g i.a. ha⁻¹), com a adição de óleo mineral na concentração de 1,25% v/v. Os dados de sobrevivência, altura e peso seco foram avaliados 21 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT) e analisados com base no desvio padrão das médias de cada tratamento para comparação entre ambos os biótipos. A partir desses experimentos, uma amostra aleatória de 9 plantas de BR-R tratadas com chlorsulfuron, 9 plantas BR-R com sulfometuron, 6 testemunhas BR-R e 3 testemunhas GA-S foram submetidas à extração de DNA e sequenciamento da ALS para verificar a presença ou ausência de substituições, bem como a avaliação dos haplótipos para melhor compreender o genótipo da herança e a relação com a resposta ao tratamento herbicida. O biótipo BR-R apresentou elevada taxa de sobrevivência aos herbicidas estudados (>88%), bem como produção de biomassa mesmo após aplicação dos tratamentos herbicida. Além disso, foram observadas a presença de duas mutações nos indivíduos BR-R, W574L e S653N, conferindo resistência a chlorsulfuron e sulfometuron, enquanto GA-S foi completamente controlado (100%) pelos três herbicidas avaliados. A resistência foi observada nos indivíduos que possuem os haplótipos homozigotos resistentes para a mutação W574L, e heterozigotos para W574L e S653N. Não foram observados indivíduos resistentes com a substituição S653N em homozigose. Porém, mesmo os em indivíduos heterozigotos, ambas as mutações resultaram na sobrevivência das plantas, corroborando com a hipótese de que a resistência à ALS é uma herança dominante e expressa o fenótipo mesmo em heterozigose.

Palavras-chave: Mutação; Dominância; W574L; S653N

Abstract

Resistance to ALS inhibitors herbicides is widely spread across *Amaranthus palmeri* populations in United States. The biotype introduced to Brazil is also resistant to this herbicide group. This research aims to characterize the resistance to ALS inhibitors in the Brazilian biotype. In the first experiment, 1X of chlorsulfuron (88 g a.i. ha⁻¹) and sulfometuron (315 g a.i. ha⁻¹) were sprayed on 28 plants of each studied biotype, collected from Mato Grosso (BR-R) and a susceptible standard from Georgia (GA-S). The second experiment was based on spraying 1X of imazethapyr + mineral oil (61 g a.e. ha⁻¹ + 1,25% v/v). Survival, hight and dry biomass data were collected 21 days after treatment (DAT) and analyzed based on standard deviation of each treatment comparing both biotypes. From these experiments, a sample of 9 BR-R individuals treated with chlorsulfuron, 9 BR-R treated with sulfometuron, 6 untreated BR-R and 3 untreated GA-S were subjected to DNA exctraction and ALS sequencing to verify whether there is presence or absence of aminoacid

substitutions, and to assess their haplotypes to better understand the inheritance genoty of resistance and its relationship with the herbicide treatment response. BR-R showed hight rate of survival plants (>88%) as well as biomass production even after treatment, and GA-S was completely controlled by all herbicides tested. Two target-site mutations were observed in BR-R individuals, W574L e S653N, conferring resistance to chlorsulfuron and sulfometuron. Resistance was noticed in homozigous resistant individuals with W574 mutation and heterozigous individuals with W574 and S653. No homozigous resistant haplotype was seen with S653 allele. However, even heterozigous individuals with any W574 or S653 substitutions survived to the herbicide application, corroborating that ALS resistance is a dominant inheritance and even heterozigous haplotypes express this phenotype.

Keywords: Target-site mutation; Dominance; W574; S653

4.1 Introdução

A acetolactato sintase (ALS; EC 2.2.1.6) ou acetohidroxiácido sintase (AHAS) é a primeira enzima envolvida na síntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (UMBARGER, 1978). Esses aminoácidos são sintetizados por bactérias, fungos e plantas, e são considerados essenciais para o metabolismo, crescimento e desenvolvimento dos organismos vivos. Em espécies vegetais, a ALS é alvo comum de herbicidas que se ligam a ela exercendo sua inibição, interrompendo a formação desses aminoácidos e consequentemente levando a planta à morte (MUHITICH et al., 1987; TAN et al., 2006).

Os herbicidas inibidores da ALS constituem o maior e um dos mais importantes grupos de herbicidas, possuindo moléculas pertencentes a cinco grupos químicos: sulfoniluréias (SU), imidazolinonas (IMI), triazolpirimidinas (TP), pirimidinil-thiobenzoatos (PB) e sulfonil-aminocarbonil-triazolinona (SCT) (SAARI et al., 1994; SANTEL et al., 1999). São herbicidas amplamente utilizados na agricultura desde sua introdução em 1982, devido às características de elevada eficácia, baixa toxicidade ao homem, animais e ao meio ambiente, necessidade de utilização de baixas doses e seletividade às culturas (OLIVEIRA JR. et al., 2011; YU e POWLES, 2014).

A ALS é responsável pela reação de condensação de duas moléculas de piruvato à forma de 2-acetolactato, que é precursor da síntese dos aminoácidos valina e leucina. A ALS pode também catalisar a condensação de piruvato e 2-ketobutirato à forma de 2-acetohidroxibutirato, precursor da isoleucina. Os herbicidas correspondentes a esse grupo atuam não competindo por substrato, mas sim inibindo a atividade enzimática, e consequentemente a formação dos aminoácidos (READE e COBB, 2002).

Os herbicidas inibidores da ALS atuam rapidamente inibindo a divisão celular em plantas suscetíveis (ROST e REYNOLDS, 1985). Isso ocorre devido a importância que os aminoácidos de cadeia lateral têm para o crescimento vegetal (RAY, 1984). Como a biossíntese desses aminoácidos acontece principalmente em regiões meristemáticas, os sintomas apresentados pelas plantas tratadas são necrose e má formação de tecidos novos (GARCÍA-CARRIJO et al., 2012). Embora esse processo ocorra rapidamente e os sintomas sejam expressos em poucos dias, as plantas levam cerca de dez a quatorze dias até a morte, que acontece quando a concentração desses aminoácidos atinge níveis críticos (READE e COBB, 2002).

Algumas características fazem com que esse grupo de herbicidas seja um dos mais utilizados na agricultura. A necessidade de baixas doses e a elevada eficácia de controle sobre os biótipos suscetíveis, somadas ao amplo espectro de controle e elevada seletividade às culturas são algumas das mais exploradas (MAZUR E FALCO, 1989). A atividade que os inibidores da ALS exercem sobre essa enzima resulta na elevada capacidade de inibição e explicam a sua eficácia agronômica e uso intensificado (RAY, 1984).

Outra característica agronômica explorada é a atividade residual e amplas janelas para aplicações. Alguns possuem ação tanto em pré quanto em pós-emergência, outros são unicamente pré ou pós-emergentes. Ressalta-se que é possível fazer o manejo baseado na utilização de herbicidas inibidores da ALS ainda que em condições de sucessão ou rotação de culturas em diferentes sistemas de produção. A diversidade de moléculas e suas características agronômicas permitem aos inibidores da ALS ampla versatilidade de uso visando a recomendação para controle de inúmeras espécies de plantas daninhas em grande variedade de culturas (TRANEL e WRIGHT, 2002).

Em contrapartida, também são esses herbicidas que possuem o maior número de casos de resistência no mundo. Segundo Heap (2017), 159 espécies foram relatadas com resistência aos herbicidas inibidores da ALS, seguido dos inibidores do fotossistema II, com 73 casos relatados, e inibidores da accase, com 48. No Brasil, existem 19 espécies resistentes aos inibidores da ALS, sendo 14 casos confirmados também de resistência cruzada a mais de um herbicida do mesmo mecanismo de ação. É comum a resistência à ALS estar associada à mais de um grupo químico pertencente ao mesmo mecanismo de ação.

Diversos fatores contribuem com a elevada ocorrência de espécies de plantas daninhas resistentes a herbicidas inibidores da ALS, podendo ser fatores biológicos, agronômicos, genéticos e ambientais. Dentre os agronômicos, pode-se citar a atividade residual existente em diversos herbicidas, o que aumenta a pressão de seleção (TRANEL e

WRIGHT, 2002). Outro fator é a elevada eficácia dos herbicidas, que acabam por selecionar indivíduos altamente resistentes, isto é, quando uma planta permanece viva após a aplicação desses herbicidas, pouco se atribui a falhas de controle.

Como fator biológico, pode-se citar o elevado nível de resistência e a ausência do custo adaptativo por conta da herança genética. Tranel e Wright (2002) e Yu e Powles (2014) relatam que, de acordo com informações disponíveis na literatura, não há custo adaptativo considerável decorrente da resistência à inibidores da ALS. A exemplo, pode-se citar o trabalho de Christoffoleti (1993), em que o autor confirmou que não existem diferenças na produção de biomassa e competitividade de *Kochia scoparia* resistente e suscetível a inibidores da ALS. Assim, uma vez que uma planta daninha consegue sobreviver ao herbicida, o crescimento, desenvolvimento e reprodução da espécie devem ocorrer regularmente se não houver interferência de fatores abióticos (clima) ou bióticos (ataques de pragas) externos.

Outro item relacionado com o número de casos de resistência à ALS é a elevada frequência inicial de biótipos resistentes numa população de plantas daninhas. De acordo com Saari et al. (1994), a ocorrência de indivíduos resistentes a chlorsulfuron e a imidazolinonas em *Arabidopsis thaliana* é estimada em aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$ em uma população que ainda não foi exposta à ação desses herbicidas. Em *Lolium rigidum*, esse valor é de $1,2 \times 10^{-4}$ (PRESTON e POWLES, 2002). Para estudos que envolvem modelos de evolução de resistência a herbicidas, os parâmetros comumente utilizados são da ordem de $1,0 \times 10^{-6}$ a frequência com que ocorrem os indivíduos resistentes numa população que ainda não teve exposição a herbicidas (MERREL, 1981). Estes valores podem ser considerados elevados na prática, pois para espécies com elevada taxa de reprodução e, conseqüentemente, alto incremento do banco de sementes, a possibilidade de existência de biótipos resistentes é pouco rara.

Outro aspecto genético é que os alelos que conferem a resistência à inibidores da ALS são dominantes (YU e POWLES, 2014), o que explica a prevalência da característica também em indivíduos heterozigotos. O gene que codifica a ALS é nuclear e os alelos de resistência são dispersos tanto por sementes quanto por grãos-de-pólen. Os alelos seguem padrões da genética mendeliana, o que ajuda a entender a rápida seleção de populações resistentes em condições de segregação e sob pressão de seleção (TRANDEL e WRIGHT, 2002).

Além disso, diversas são as mutações na sequência de aminoácidos que constituem a ALS capazes de conferir resistência a esses herbicidas. A ALS é composta por cerca de 670

aminoácidos e pelo menos 24 substituições em oito diferentes posições da enzima – 122, 197, 205, 376, 377, 574, 653 e 654 – são conhecidas por conferir resistência a herbicidas (TRANEL e WRIGHT, 2002; POWLES e YU, 2010; MASSA et al., 2011; TRANEL et al., 2017).

As mutações têm sensibilidade diferente devido à conformidade das moléculas herbicidas (SHANER, 1991). Geralmente, algumas mutações conferem resistência a grupos químicos específicos, como acontece com a Ala-122 para imidazolinonas, Pro-197 para sulfoniluréias (YU e POWLES, 2014). Porém, algumas conferem resistência a mais de um grupo químico, como a Ala-205, que atribui resistência a todas as clases de inibidores da ALS (BROSNAN et al., 2016).

Algumas plantas daninhas possuem como mecanismo de resistência o metabolismo diferencial. *Lolium rigidum* (HOLTUM et al., 1991; CHRISTOPHER et al., 1992; COTTERMAN e SAARI, 1992), *Alopecurus myosuroides* (KEMP et al., 1990, MOSS e CUSSANS, 1991), *Avena fatua*, *Echinochloa phyllopogon* e *Sinapsis arvensis* (YU e POWLES, 2014) são exemplos de espécies em que algumas populações são capazes de realizar a desintoxicação pelo herbicida através de seu metabolismo. Esse mecanismo imita o processo de tolerância de algumas culturas a esse grupo de herbicidas e, geralmente, está associado à um fator de resistência inferior a 10 (HALL et al., 1994; YU e POWLES, 2014;). Recentemente, biótipos de *A. tuberculatus* e *A. palmeri* com esse mecanismo de resistência também foram identificados (GUO et al., 2015; NAKKA et al., 2017). A diversidade de mutações e mecanismos não relacionados ao sítio de ação explicam também a abundância de alelos que conferem resistência à inibidores da ALS.

A resistência a inibidores da ALS foi reportada em *A. palmeri* pela primeira vez no estado do Kansas, nos EUA, em 1993, e rapidamente se difundiu na região sul, entre os estados do Arkansas, Tennessee, Carolina do Norte, Carolina do Sul e Geórgia (BOND, et al., 2006; HEAP, 2017). Esse fato aconteceu principalmente em áreas de produção de soja e algodão, devido a ampla utilização desses herbicidas. O biótipo introduzido no Brasil possui resistência cruzada aos herbicidas chlorimuron, imazethapyr e cloransulan (GONÇALVES NETTO et al., 2016), porém, ainda se desconhece o mecanismo de resistência envolvido. Até o momento, as mutações Ala-205, Asp-376 e Asp-377 foram observadas em algumas espécies de *Amaranthus*, porém não em *A. palmeri*. Em algumas populações de *A. palmeri* resistentes foram encontradas as mutações Ala-122, Pro-197, Trp-574 e Ser-653 (MOLIN et al., 2016; NAKKA et al., 2017; LARRAN et al., 2017; TRANEL, et al. 2017).

Os objetivos dessa seção foram avaliar a suscetibilidade do biótipo brasileiro de *A. palmeri* aos herbicidas chlorsulfuron, sulfometuron e imazethapyr, e investigar a presença de mutações na sequência de aminoácidos presentes na enzima ALS e relacioná-las com a sobrevivência após exposição dos biótipos a herbicidas dos diferentes grupos químicos, além de compreender como os haplótipos estão distribuídos dentro das condições investigadas.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Suscetibilidade dos biótipos BR-R e GA-S de *Amaranthus palmeri* aos herbicidas chlorsulfuron, sulfometuron e imazethapyr

Esse estudo tem como objetivo avaliar a resistência dos biótipos BR-R e GA-S aos herbicidas chlorsulfuron (SU), sulfometuron-methyl (SU) e imazethapyr (IMI), sendo GA-S utilizado como padrão suscetível. O estudo foi realizado em casa de vegetação do Laboratório de Plantas Daninhas da Colorado State University, em Fort Collins, CO.

Dois experimentos foram conduzidos. Na primeira etapa, 28 plantas de cada biótipo foram tratadas com as sulfoniluréias, chlorsulfuron e sulfometuron-methyl. Na segunda etapa, o procedimento foi realizado com 36 plantas e o herbicida imazethapyr. As doses utilizadas foram a dose recomendada de cada herbicida para o controle de *A. palmeri*: chlorsulfuron a 88 g i.a. ha⁻¹, sulfometuron-methyl a 315 g i.a. ha⁻¹ e imazethapyr a 61 g. e.a. ha⁻¹ com adição de 1,25% v/v de óleo mineral. A aplicação dos tratamentos foi feita em câmara de pulverização, equipada com bicos de jato plano e abertura tipo leque (TeeJet 8002EVS) com pressão constante de 172 kPa e volume de calda proporcional a 187 L ha⁻¹.

Os dados de altura (cm), biomassa (g) e sobrevivência (%) foram coletados 21 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT). Os dados foram comparados com base no desvio padrão da média dos tratamentos, para identificar diferenças significativas de cada biótipo (BR-R e GA-S) com a respectiva testemunha sem aplicação do herbicida e avaliação de diferenças significativas entre os biótipos.

4.2.2 Sequenciamento genético da ALS dos biótipos BR-R e GA-S e acesso aos haplótipos

Esse experimento foi realizado para observar a presença ou ausência de substituições de aminoácidos na sequência do gene que codifica a ALS. Para isso, aproximadamente 50 mg

de tecido vegetal foram extraídos das folhas de cada indivíduo, sendo três testemunhas de GA-S, seis testemunhas de BR-R, nove plantas que sobreviveram a 315 g i.a. ha⁻¹ sulfometuron-methyl, e nove BR-R que sobreviveram a 88 g i.a. ha⁻¹ chlorsulfuron. A extração de DNA foi feita conforme descrito no capítulo anterior.

O gene completo da ALS foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se os primers forward: 5'- ATGGCGTCCACTTCAACAAACC -3' e reverse 5'- CTAATAAGCCCTTCTTCCATCACCC -3'. 30 µL das reações foram misturadas seguindo o protocolo padrão de fusão termocientífica da polymerase e 20 ng do DNA padrão. As reações foram processadas por 32 ciclos, com cada etapa do procoloco conforme descritas a seguir: 98 °C por 10 s, 62 °C por 20 s, e 72 °C por 90 s. Os produtos da PCR foram submetidos à corrida em gel de agarose a 1% para verificar a amplificação das bandas. As bandas esperadas de 2010 pb foram extraídas do gel purificado seguindo o protocolo padrão fornecido pelo kit de extração *QIAquick gel extraction* da Qiagen. Os produtos purificados da PCR foram sequenciados utilizando ambos os *primers* utilizados na seção anterior para a amplificação, assim como os quatro primers de sequenciamento: Seq_FP1 5'- AGTTTGTATTGCCACTTCTGGTCC-3', Seq_FP2 5'- GAAATCCTCGCCAATGGCTGAC-3', Seq_RP1 5'- GTCAGCCATTGGCGAGGATTTC-3', Seq_RP2 5'-TGGACCAGAAGTGGCAATACAAAC-3'. As leituras do sequenciamento pelo método de Sanger foram analisadas utilizando o Editor de Plasmídio A (aPe) e os pares de bases heterozigotos foram identificados na sequência por inspeção manual. Os aminoácidos traduzidos obtidos dos biótipos BR-R e GA-S foram comparados a uma sequência suscetível conhecida da ALS (MOLIN ET AL., 2016), disponível no GeneBank com código de acesso à proteína AMS38337.1.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Suscetibilidade dos biótipos BR-R e GA-S de *Amaranthus palmeri* aos herbicidas chlorsulfuron, sulfometuron e imazethapyr

Os indivíduos do biótipo BR-R apresentaram alta porcentagem de sobrevivência após tratamento com os herbicidas chlorsulfuron ($\geq 96\%$), sulfometuron ($\geq 88\%$) e imazethapyr (100%), enquanto a população GA-S foi completamente controlada (100%) (Tabela 2).

Os outros parâmetros avaliados também apresentaram diferenças. A altura das plantas e o peso seco do biótipo GA-S reduziram significativamente após aplicação dos tratamentos, indicando a alta suscetibilidade do biótipo. Para BR-R, os tratamentos diferem com relação ao GA-S, e em alguns parâmetros são estatisticamente iguais à testemunha sem aplicação, indicando ineficácia de controle do biótipo e confirmando os dados observados pela elevada taxa de sobrevivência (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Sobrevivência (%), altura (cm) e biomassa (g) de *Amaranthus palmeri* coletado no Mato Grosso, Brasil (BR-R) e padrão suscetível proveniente da Geórgia, EUA (GA-S) 21 dias após tratamento com chlorsulfuron (88 g i.a. ha⁻¹), sulfometuron (315 g i.a. ha⁻¹), e imazethapyr (61 g i.a. ha⁻¹). Fort Collins, CO, 2018.

Biótipo	n	Herbicida	Sobrevivência (%)	Altura (cm)	Biomassa (g)
BR-R	28	Testemunha	100 (0) A	22,8 (8,2) AB	2,3 (0,5) A
BR-R	28	Chlorsulfuron	96 (20) A	16,4 (6,0) C	1,8 (0,8) BC
BR-R	28	Sulfometuron	88 (33) A	18,7 (8,4) BC	1,5 (0,7) C
GA-S	28	Testemunha	100 (0) A	27,5 (6,4) A	2,1 (0,7) AB
GA-S	28	Chlorsulfuron	0 (0) B	8,1 (5,2) D	0,9 (0,5) D
GA-S	28	Sulfometuron	0 (0) B	8,0 (4,3) D	0,8 (0,5) D
BR-R	36	Testemunha	100 (0) A	17,8 (3,3) B	1,3 (0,5) B
BR-R	36	Imazethapyr	100 (0) A	19,3 (3,0) AB	1,8 (0,3) A
GA-S	36	Testemunha	100 (0) A	20,5 (4,8) A	1,5 (0,5) B
GA-S	36	Imazethapyr	0 (0) B	7,4 (3,3) C	0,8 (0,4) C

n: número de plantas utilizadas por tratamento; %: porcentagem de controle; cm: centímetros; g: gramas; O desvio padrão está representado em parênteses e as letras indicam diferenças significativas a P=0.05;

Assim, os indivíduos da população BR-R são resistentes aos três herbicidas inibidores da ALS testados, chlorsulfuron, sulfometuron, e imazethapyr, enquanto os indivíduos GA-S são suscetíveis (Tabela 4.1). A elevada taxa de sobrevivência de BR-R após o tratamento é consistente com observações de alto nível de resistência à ALS feitas anteriormente em *A. palmeri* (SPRAGUE et al., 1997; BURGOS et al., 2001; FRANSSEN et al., 2001; TRANEL e WRIGHT, 2002; PADZOLT e TRANEL, 2007; POWLES e YU, 2010).

Figura 4.1 – Suscetibilidade de *A. palmeri* aos herbicidas inibidores da ALS chlorsulfuron (88 g a.i. ha⁻¹), sulfometuron (315 g a.i. ha⁻¹), e imazethapyr (61 g a.e. ha⁻¹). Fort Collins, CO, 2018.

4.3.2 Sequenciamento genético da enzima ALS dos biótipos BR-R e GA-S e acesso aos haplótipos

Os alelos que atribuem resistência à ALS são bastante frequentes na natureza, sendo diversas as substituições na enzima capazes de atribuir resistência a esses herbicidas (TRANEL e WRIGHT, 2002). Os sequenciamentos do gene da ALS de ambas populações (BR-R e GA-S) mostraram duas mutações independentes nas sequências da ALS de plantas do biótipo BR-R, resultando na substituição de Triptofano por Leucina na posição 574 (W574L) e Serina por Asparagina na posição 653 (S653N) (Tabela 4.2). A mutação W574L é conhecida por conferir resistência tanto às imidazolinonas quanto às sulfoniluréias, enquanto

a S653N é conhecida por conferir resistência somente às imidazolinonas (YU e POWLES, 2014).

Tabela 4.2 – Alinhamento de sequências de aminoácidos da ALS de *A. palmeri* indicando as mutações W574L e S653N. Fort Collins, CO, 2018.

Biótipo	Mutação	
	W574L	S673N
	TGG → TTG	AGC → AAC
>AMS38337.1	NNQHLGMVVQWEDRFYKANRA	HQEHVLPMPISGA AFKDTITE
>GA-S1	NNQHLGMVVQWEDRFYKANRA	HQEHVLPMPISGA AFKDTITE
>GA-S2	NNQHLGMVVQWEDRFYKANRA	HQEHVLPMPISGA AFKDTITE
>GA-S3	NNQHLGMVVQWEDRFYKANRA	HQEHVLPMPISGA AFKDTITE
>BR-R1	NNQHLGMVVQWEDRFYKANRA	HQEHVLPMPISGA AFKDTITE
>BR-R2	NNQHLGMVVQLED RFYKANRA	HQEHVLPMPINGA AFKDTITE
>BR-R3	NNQHLGMVVQLED RFYKANRA	HQEHVLPMPISGA AFKDTITE
>BR-R4	NNQHLGMVVQWEDRFYKANRA	HQEHVLPMPINGA AFKDTITE
>BR-R5	NNQHLGMVVQLED RFYKANRA	HQEHVLPMPISGA AFKDTITE

AMS38337.1: sequência da ALS suscetível a herbicidas obtida no GeneBank; GA-S: biótipo suscetível proveniente da Geórgia, EUA; BR-R: biótipo resistente coletado no Mato Grosso, Brasil.

Através do acesso aos haplótipos é possível observar que todos os indivíduos BR-R sequenciados possuem pelo menos um alelo que confere resistência, seja na posição W574 (alelo resistente L) ou S653 (alelo resistente Asp) da ALS, independentemente da aplicação do herbicida (Tabela 4.3). Todos os indivíduos GA-S são homozigotos suscetíveis para ambos alelos W574 e S653.

Ambas mutações encontradas no biótipo brasileiro de *A. palmeri* são bastante frequentes em outras espécies, inclusive do gênero *Amaranthus*. Algumas populações de *A. hybridus* apresentaram a substituição S653N conferindo resistência a imazethapyr, com fator de resistência de 261 a 537 (WHALEY et al., 2006). McNaughton et al. (2005) observaram diferentes padrões de sobrevivência a imazethapyr e thifensulfuron em biótipos de *A. retroflexus* e *A. powellii*, encontrando as substituições W574L em *A. retroflexus* e S653N em *A. retroflexus* e *A. powellii*, além de outras substituições não observadas em BR-R, confirmando a diversidade genética de mutações da ALS existentes em biótipos de *Amaranthus* de diferentes regiões geográficas.

Tabela 4.3 – Acesso aos haplótipos correspondente às substituições W574L e S653N de amostras de indivíduos de BR-R que sobreviveram a aplicação de chlorsulfuron e sulfometuron, e BR-R e GA-S sem aplicação de herbicidas. Fort Collins, CO, 2018.

População	Tratamento	Indivíduo	Mutação e Genótipo	
			Trp574Leu	Ser653Asp
			TGG → TTG	AGC → AAC
BR-R	Chlorsulfuron	1	Rr	rr
		2	Rr	rr
		3	rr	Rr
		4	RR	rr
		5	Rr	rr
		6	rr	Rr
		7	Rr	Rr
		8	rr	Rr
		9	Rr	rr
	Sulfometuron	1	rr	Rr
		2	Rr	rr
		3	Rr	rr
		4	RR	rr
		5	Rr	rr
		6	Rr	Rr
		7	Rr	Rr
		8	RR	rr
		9	Rr	Rr
	Testemunha	1	Rr	rr
		2	Rr	Rr
		3	RR	rr
		4	Rr	rr
		5	Rr	Rr
		6	RR	rr
GA-S	Testemunha	1	rr	rr
		2	rr	rr
		3	rr	rr

W: triptofano; L: leucina; S: serina; N: asparagina; RR: homozigotos resistentes; Rr: heterozigotos resistentes; rr: homozigotos suscetíveis.

Nos Estados Unidos, ambas as substituições W574L e S653N foram observadas em *A. palmeri*, e em condições experimentais a substituição W574L foi transferida de *A. palmeri* para híbridos de *A. palmeri* e *A. spinosus* (MOLIN et al., 2016). Berger et al. (2016) relataram resistência a ALS em *A. quitensis* e *A. palmeri* na Argentina e observaram a presença da S653N em *A. quitensis* mas não identificando substituições na sequência da ALS em *A.*

palmeri, sugerindo que a população de *A. palmeri* da argentina possua mecanismo deresistência não decorrente de alterações na sequência de aminoácidos da enzima. No entanto, pesquisas recentes identificaram populações de *A. palmeri* com as mutações A122S, W574L e S653N, sendo esta frequentemente relacionada à resistência ao grupo das imidazolinonas, e W574L à sulfoniluréias e imidazolinonas (LARRAN et al., 2017).

Em nabiça (*Raphanus raphanistrum*) a S653N confere resistência às imidazolinonas, enquanto W574L homozigoto confere resistência a sulfoniluréias, imidazolinonas e triazolpirimidinas, três famílias de inibidores da ALS (YU et al., 2012). A presença da W574L atribui altos níveis de resistência a esses três grupos em *A. tuberculatus*, enquanto a S653N geralmente está relacionada com resistência à imidazolinonas (PADZOLT e TRANEL, 2007), conforme observado para BR-R.

Os indivíduos BR-R tanto heterozigotos quanto homozigotos para W574L, sobreviveram às sulfonilureias (Tabela 4.3). Não foram observados indivíduos resistentes e homozigotos para S653N. Porém, ambas as mutações resultaram na sobrevivência das plantas mesmo em heterozigotos. Essa observação corrobora com a hipótese de que a resistência à ALS é uma herança dominante e expressa o fenótipo mesmo em heterozigose (TRANEL e WRIGHT, 2002; YU e POWLES, 2010), e explica a alta taxa de sobrevivência dos mutantes heterozigotos de BR-R (>88%; Tabela 4.1).

Nenhuma outra mutação foi encontrada em BR-R, porém quatro plantas desse biótipo que sobreviveram ao tratamento herbicida a ambas as sulfoniluréias utilizadas foram homozigotos suscetíveis para W574L e heterozigotos para S653N. Uma vez que a substituição S653N não é conhecida por conferir resistência às sulfoniluréias, sugere-se que esses quatro indivíduos possam ter outro mecanismo de resistência que não esteja relacionado a alterações no sítio de ação. Uma mutação diferente e não detectada pode ser considerada improvável, uma vez que o gene que codifica a ALS foi sequenciado por completo. Todas as sequências da ALS do biótipo GA-S foram suscetíveis para ambas as mutações W574L e S653N (Tabela 4.3).

4.4 Conclusões

O biótipo brasileiro de *A. palmeri* introduzido no Brasil é resistente aos herbicidas inibidores da ALS do grupo das sulfoniluréias e imidazolinonas, com elevado índice de resistência, tipicamente observado em populações de *A. palmeri* resistentes à ALS.

Duas substituições que atribuem resistência foram encontradas na sequência do gene que codifica a enzima: W574L, atribuindo resistência a chlorsulfuron e sulfometuron, e S653N atribuindo resistência a imidazolinonas.

A substituição W574 foi observada tanto em indivíduos homozigotos quanto em heterozigotos, enquanto S653N foi observada somente em heterozigose.

Outros mecanismos de resistência não relacionados ao sítio de ação podem estar em segregação na população de *A. palmeri* coletada no estado do Mato Grosso.

Referências bibliográficas

BERGER, S.; MADEIRA, P.T.; FERREL, J.; GETTYS, L.; MORICHETTI, S.; CANTERO, J.J.; NUÑEZ, C. Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) identification and documentation of ALS-resistance in Argentina. **Weed Science**, v. 64, p. 312-320, 2016.

BOND, J.A.; OLIVER, L.R.; STEPHENSON IV, D.O. Response of Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) accessions to glyphosate, fomesafen, and pyriithiobac. **Weed Technology**, v. 20, p. 885-892, 2006.

BROSNAN, J.T.; VARGAS, J.J.; BREEDEN, G.K.; GRIER, L.; APONTE, R.A.; TRESCH, S.; LAFOREST, M. A new amino acid substitution (ALA-205-Phe) in acetolactate synthase (ALS) confers broad spectrum resistance to ALS-inhibiting herbicides. **Planta**, v. 243, p. 149-159, 2016.

BURGOS, N.R.; KUK, Y.I.; TALBERT, R.E. *Amaranthus palmeri* resistance and differential tolerance of *Amaranthus palmeri* and *Amaranthus hybridus* to ALS-inhibitor herbicides. **Pest Management Science**, v. 57, p. 449-457, 2001.

CHRISTOFFOLETI, P.J. **Growth, competitive ability, and fitness of sulfonylurea resistant and susceptible biotypes**. 1992. 198 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia e Ciência das Plantas Daninhas). Colorado State University, Fort Collins, 1992.

CHRISTOPHER, J.T.; POWLES, S.B.; HOLTUM, J.A.M. Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*) involves at least two mechanisms. **Plant Physiology**, v. 100, p. 1909-1913, 1992.

COTTERMAN, J.C.; SAARI, L.L. Rapid metabolic inactivation is the basis for cross-resistance to chlorsulfuron in diclofop-methyl-resistant rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) biotype SR4/84. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 43, p. 182-192, 1992.

FRANSSEN, A.S.; SKINNER, D.Z.; AL-KHATIB, K.; HORAK, M.J.; KULAKOW, P.A. Interspecific hybridization and gene flow of ALS resistance in *Amaranthus* species. **Weed Science**, v. 49, p. 598-606, 2001.

GARCÍA-GARIJO, A.; PALMA, F.; IRIBARNE, C.; LLUCH, C.; TEJERA, N.A. Alterations induced by imazamox on acetohydroxyacid synthase activity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) depend on leaf position. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 104, p. 72-76, 2012.

GONÇALVES NETTO, A.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S.J.P.; BORGATO, E.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Multiple resistance of *Amaranthus palmeri* to ALS and EPSPS inhibiting herbicides in the state of Mato Grosso, Brazil. **Planta Daninha**, v. 34, n. 3, p. 581-587, 2016.

GUO, J.; RIGGINS, C.W.; HAUSMAN, N.E.; HAGER, A.G.; RIECHERS, D.E.; DAVIS, A.S.; TRANEL, P.J. Nontarget-site resistance to ALS inhibitors in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). **Weed Science**, v. 62, n. 2, p. 399-407, 2015.

HALL, L.M.; HOLTUM, J.A.M.; POWLES, S.B. Mechanisms responsible for cross resistance and multiple resistance. In: POWLES, S.B.; HOLTUM, J.A.M. (Eds.) **Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry**. Ann Arbor, MI: Lewis, p. 243-262, 1994.

HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. Disponível em: www.weedscience.org. Acesso em: 01/12/2017.

HOLTUM, J.A.; MATTHEWS, J.M.; HÄUSLER, R.E.; LILJEGREN, D.R.; POWLES, S.B. Cross-resistance to herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). **Plant Physiology**, v. 97, p. 1026-1034, 1991.

KEMP, M.S.; MOSS, S.R.; THOMAS, T.H. Herbicide resistance in *Alopecurus myosuroides*. In: GREEN, M.B.; LEBARON, H.M.; MOBERG, W.K. (Eds.) **Managing Resistance to Agrochemicals: From Fundamental Research to Practical Strategies**, Washington DC: American Chemical Society, p. 376-393, 1990.

LARRAN, A.S.; PALMIERI, V.E.; PEROTTI, V.E.; LIEBER, L.; TUESCA, D.; PERMINGEAT, H.R. Target-site resistance to acetolactate synthase (ALS)-inhibiting herbicides in *Amaranthus palmeri* from Argentina. **Pest Management Science**, v. 73, p. 2578-2584, 2017.

MASSA, D.; KRENZ, B.; GERHARDS, R. Target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Apera spica-venti* populations is conferred by documented and previously unknown mutations. **Weed Research**, v. 51, p. 294-303, 2011.

MAZUR, B.J.; FALCO, S.C. The development of herbicide resistant crops. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 441-470, 1989.

McNAUGHTON, K.E.; LETARTE, J.; LEE, E.A.; TARDIFF, F.J. Mutations in ALS confer herbicide resistance in redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) and Powell amaranth (*Amaranthus powellii*). **Weed Science**, v. 53, p. 17-22, 2005.

MERREI, D.J. **Ecological genetics**. University of Minnesota Press, Minneapolis, 500p., 1981.

MOLIN, W.T.; NANDULA, V.K.; WRIGHT, A.A.; BOND, J.A. Transfer and expression of ALS-inhibitor resistance from Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) to an *A. spinosus* x *A. palmeri* hybrid. **Weed Science**, v. 64, p. 240-247, 2016.

MOSS, S.R.; CUSSANS, G.W. The development of herbicide resistant populations of *Alopecurus myosuroides* (black-grass) in England. In: CASELEY, J.C.; CUSSANS, G.W.; ATKIN, R.K. (Eds.) **Herbicide Resistance in Weeds and Crops**. Oxford, U.K.: Butterworth-Heinemann, p. 445-456, 1991.

MUHITCH, M.J.; SHANER, D.L.; STIDHAM, M.A. Imidazolinones and acetohydroxyacid synthase from higher plants. **Plant Physiology**, v. 83, p. 451-456, 1987.

NAKKA, S.; THOMSON, C.T.; PETERSON, D.E.; JUGULAM, M. Target site-based and non-target site based resistance to ALS inhibitors in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). **Weed Science**, v. 65, n. 6, p. 681-689, 2017.

OLIVEIRA JR., R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba, PR: Ed. Omnipax, 2011, 348p.

PADZOLT, W.L.; TRANEL, P.J. Multiple ALS mutations confer herbicide resistance in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). **Weed Science**, v. 55, p. 421-428, 2007.

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

PRESTON, C.; POWLES, S.B. Evolution of herbicide resistance in weeds: initial frequency of target site-based resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. **Heredity**, v. 88, p. 8-13, 2002.

RAY, T.B. Site of action of chlorsulfuron: inhibition of valine and isoleucine biosynthesis of plants. **Plant Physiology**, v. 75, p. 827-831, 1984.

READE, J.P.H.; COBB, A.H. Herbicides: modes of action and metabolism. In: NAYLOR, R.E.L. (Ed.) **Weed Management Handbook**, 9^a Ed. British Crop Protection Enterprises, p. 134-170, 2002.

ROST, T.L.; REYNOLDS, T. Reversal of chlorsulfuron-induced inhibition of mitotic entry by isoleucine and valine. **Plant Physiology**, v. 77, p. 481-482, 1985.

SAARI, L.L.; COTTERMAN, J.C.; THILL, D.C. Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicide. In: POWLES, S.B.; HOLTUM, J.A.M. (Eds.) **Herbicide Resistance in Plants, Biology and Biochemistry**. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, p. 83-139, 1994.

SANTEL, H.J.; BOWDEN, B.A.; SORENSEN, V.M.; MULLER, K.H. Flucarbazone-sodium: a new herbicide for grass control in wheat. **Proceedings of the Western Society of Weed Science**. Colorado Springs, CO. vol. 1, p. 124-125, 1999.

SHANER, D.L. Physiological effects of the imidazolinone herbicides. In: SHNER, D.L.; O'CONNOR, L. (Ed.) **The Imidazolinone Herbicides**. Ann Arbor, MI: Lewis, p. 129-138, 1991.

SPRAGUE, C.L.; STOLLER, E.W.; WAX, L.M.; HORAK, M.J. Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) and common waterhemp (*Amaranthus rudis*) resistance to selected ALS-inhibiting herbicides. **Weed Science**, v. 45, p. 192-197, 1997.

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

TRANEL, P.J.; WRIGHT, T.R.; HEAP, I.M. **Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors**. Online <http://www.weedscience.com>. Acesso em: 20/11/2017.

TRANEL, P.J; WRIGHT, T.R. Resistance of weeds to ALS inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, v. 50, p. 700-712, 2002.

UMBARGER, H. E. Amino acid biosynthesis and its regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 47, p. 533–606, 1978.

WHALEY, C.M.; WILSON, H.P.; WESTWOOD, J.H. ALS resistance in several smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*) biotypes. **Weed Science**, v. 54, p. 828-832, 2006.

YU, Q.; HAN, H.; LI, M.; PURBA, E.; WALSH, M.J.; POWLES, S.B. Resistance evaluation for herbicide resistance-endowing acetolactate synthase (ALS) gene mutations using *Raphanus raphanistrum* populations homozygous for specific ALS mutations. **Weed Research**, v. 52, p. 178-186, 2012.

YU, Q.; POWLES, S. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. **Pest Management Science**, v. 70, p. 1340-1350, 2014.

5. CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE *Amaranthus palmeri* AO HERBICIDA GLYPHOSATE

Resumo

O glyphosate é o herbicida mais utilizado no mundo e nos últimos anos os casos de resistência aumentaram devido, principalmente, à utilização de culturas geneticamente modificadas com tolerância a esse herbicida. Um biótipo de *Amaranthus palmeri* foi introduzido no Brasil já resistente ao glyphosate, e para a caracterização da resistência são necessários estudos comparativos com um biótipo suscetível. Para isso, quatro experimentos foram realizados comparando-se o biótipo coletado no estado do Mato Grosso, BR (BR-R) e um suscetível proveniente do estado da Geórgia, EUA (GA-S). Um experimento de curva de dose resposta foi conduzido com as doses de glyphosate de 0, 0,05, 0,08, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, e 4,8 kg ha⁻¹. Na segunda repetição desse experimento, a dose de 8 kg ha⁻¹ de glyphosate foi incluída aos tratamentos. Os dados de mortalidade foram coletados aos 21 dias após aplicação dos tratamentos (DAT) e analisados por regressão não-linear e, uma vez que não houve diferenças estatísticas entre os experimentos, os dados foram agrupados. Um bioensaio de acúmulo de chiquimato com as doses de 0, 100, 500 e 1000 µM de glyphosate também foi realizado comparando-se os biótipos BR-R e GA-S com uma curva padrão. Os dados foram submetidos ao Teste t para averiguar significância entre ambos os biótipos. Para confirmação do mecanismo de resistência, uma PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foi conduzida para se determinar o número de cópias do gene da EPSPS de BR-R e GA-S, sendo calculado por $2^{-\Delta Ct}$, com $\Delta Ct = [(Ct, ALS) - (Ct, EPSPS)]$. Foram utilizadas repetições para calcular a média e erro padrão. Os resultados foram expressos em proporções de aumento de cópias da EPSPS em relação à ALS. As curvas de dose-resposta resultaram em DL₅₀ de 274 para GA-S e 4.426 g e.a. de glyphosate ha⁻¹ para BR-R, indicando um fator de resistência (R/S) de 16 no primeiro experimento, e 68 para GA-S e 3.400 g e.a. de glyphosate ha⁻¹ para BR-R, com R/S de 50 no segundo experimento, confirmando a resistência a glyphosate pela população brasileira de *A. palmeri*, e demonstrando que BR-R possui DL₅₀ superior ao dobro da dose comercial de glyphosate tipicamente utilizada (800 a 1.000 g e.a. ha⁻¹). O bioensaio de acúmulo de chiquimato mostrou clara diferença entre os biótipos, em que o BR-R não apresentou acúmulo, corroborando a resistência. A contagem da qPCR em tempo real indicou que os indivíduos GA-S possuem no máximo 1,5 cópias da EPSPS relativas à ALS, enquanto os indivíduos BR-R possuem entre 50 e 179. Esses resultados confirmam a resistência de BR-R ao glyphosate. O mecanismo que confere resistência em BR-R é a amplificação gênica, conforme previamente relatado em *A. palmeri* na literatura.

Palavras-chave: Dose resposta; EPSPS; Amplificação gênica

Abstract

Glyphosate is the most widely used herbicide in the world and in the last past years the cases of resistant weeds increased mainly due to the adoption of genetically modified crops tolerant to this herbicide. A biotype of Palmer Amaranth has been introduced in Brazil already resistant to glyphosate, and to characterize herbicide resistance studies comparing with a susceptible biotype are needed. Four experiments were performed comparing the biotype collected in the state of Mato Grosso, Brazil (BR-R) with a susceptible biotype from Georgia, USA (GA-S). A dose-response curve was performed using the following rates of glyphosate: 0, 0,05, 0,08, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 and 4,8 kg ha⁻¹. In the second run, 8 kg glyphosate ha⁻¹ was added to the treatments. Mortality and biomass (g) data were collected 21 days after treatment

(DAT) and analyzed by non-linear regression model and, once no significance was identified between both runs, data of both experiments were compiled. A shikimate accumulation bioassay was performed with 0, 100, 50 and 1000 μM of glyphosate comparing both BR-R and GA-S biotypes to a standard shikimate accumulation curve. Data was submitted to T test to verify whether there was significance between biotypes. To confirm its mechanism of resistance, a real-time qPCR was performed to determine the number of copies of the EPSPS gene of BR-R and GA-S, calculating it with $2^{-\Delta\text{Ct}}$, with $\Delta\text{Ct} = [(\text{Ct, ALS}) - (\text{Ct, EPSPS})]$. Replicates were used to calculate the means and the standard error. Results were expressed in proportions of increased EPSPS copy number relatives to ALS. Dose-response curves data showed a LD_{50} to GA-S of 274 g a.e. glyphosate ha^{-1} and to BR-R of 4,426 g a.e. ha^{-1} , with a resistance factor (R/S) of 16-fold in the first run, and 68 for GA-S and 3,400 for BR-R in the second run, with R/S of 50-fold, confirming that the Brazilian biotype of *A. palmeri* is resistant to glyphosate and demonstrating that BR-R has a LD_{50} higher to the double of the typical field rate (ranging between 800 and 100 g a.e. ha^{-1}). Shikimate bioassay showed a clear difference between both biotypes, which BR-R did not present any accumulation, therefore being resistant. Real-time qPCR showed that GA-S individuals had up to 1,5 copies of EPSPS enzyme relatives to ALS, while BR-R individuals had between 50 and 179. These results confirm that BR-R is indeed resistant to glyphosate. The mechanism conferring resistance in BR-R is increased EPSPS copy number, as previous reported in *A. palmeri* in the literature.

Keywords: Dose-response; EPSPS; Gene amplification

5.1 Introdução

O glyphosate é o herbicida mais utilizado em sistemas agrícolas pelo mundo todo (DUKE e POWLES, 2008). É não-seletivo, de rápida absorção, ação sistêmica e altamente eficaz no controle de plantas daninhas. É absorvido pelas folhas, transloca principalmente via floema, e atua em plantas anuais e perenes. Vem sendo utilizado nos mais variados sistemas de produção desde a sua descoberta em 1974. Nas últimas décadas, seu uso se tornou mais popular após a adoção/comercialização de culturas geneticamente modificadas com tolerância ao herbicida (DILL et al., 2008).

A molécula de glyphosate atua inibindo a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS; EC 2.5.1.19) e, conseqüentemente, bloqueando a rota de síntese dos aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano (POWLES e YU, 2010). Após a aplicação, o glyphosate rapidamente transloca até os tecidos meristemáticos, onde inicia sua ação, causando como sintomas a clorose dos tecidos e morte do meristema apical. Com a ausência dos aminoácidos, o crescimento é interrompido e a planta cessa o seu desenvolvimento até atingir a morte.

A EPSPS é responsável pela conversão do chiquimato-3-fosfato e fosfoenolpiruvato em EPSP e fosfato inorgânico na rota do ácido chiquímico. Essa rota metabólica é responsável por cerca de 20% de todo o fluxo de carbono, e cerca de 35% de todos os compostos fenólicos na planta (BOUDET et al., 1985). O glyphosate compete pelo mesmo sítio de ação da enzima fosfoenolpiruvil-carboxilase (PEP carboxilase), impedindo que a rota metabólica tenha continuidade e forme os substratos necessários para as reações e síntese dos aminoácidos (SCHONBURN et al., 2001; ESCHENBURG et al., 2002; HEALY-FRIED et al., 2007).

Alguns fatores impulsionaram a ampla aceitação e adoção do uso do glyphosate. A queda de sua patente no ano 2000 e a comercialização das culturas tolerantes ao herbicida favoreceram a utilização do glyphosate em larga escala (DUKE e POWLES, 2008). Essa tecnologia trouxe bastante praticidade aos agricultores, devido ao amplo espectro de controle do herbicida e ausência de fitotoxicidade às culturas, antes vista com o uso de herbicidas pré- ou pós-emergentes (ELMORE et al., 2001; FERRELL e WIT, 2002; JOHNSON et al., 2000; NOLTE e YOUNG, 2002). Com esses benefícios, a adoção das culturas tolerantes ao glyphosate rapidamente atingiu níveis elevados em termos de área cultivada (GREEN, 2012; DUKE E POWLES, 2008).

As culturas geneticamente modificadas foram lançadas nos Estados Unidos em 1994 (BORÉM e SANTOS, 2008). Quando sua utilização começou a se intensificar, não havia relatos de casos de resistência e, portanto, também não se conheciam mecanismos que conferem resistência ao glyphosate ocorrendo naturalmente em plantas daninhas (DYER, 1994; POWLES e HOLTUM, 1994). No entanto, o uso repetitivo do herbicida, decorrente da utilização de culturas tolerantes, atuou como pressão de seleção, resultando no surgimento de biótipos resistentes (OWEN e ZELAYA, 2005).

O primeiro relato aconteceu na Austrália, com *Lolium rigidum* (POWLES et al., 1998) e desde essa identificação o número de casos vêm aumentando em diversos locais do mundo. Em 2000 começaram a surgir os primeiros casos de resistência ao glyphosate nos EUA com a buva (*Conyza canadensis*) no estado de Delaware (VANGESSEL, 2001), que rapidamente foi confirmada também nos estados de Maryland, Ohio, Iowa, Indiana (HEAP, 2017). Em seguida, outras espécies foram relatadas com resistência ao herbicida no país, como *Lolium perenne* spp. *multiflorum*, *Ambrosia artemisiifolia* e *A. trifida*. (HEAP, 2017).

No Brasil, o primeiro relato de resistência ao glyphosate ocorreu no Rio Grande do Sul em 2004, se tratando de *Lolium perenne* spp. *multiflorum* (ROMAN et al., 2004), seguido de espécies de buva em 2005, *Conyza bonariensis* e *C. canadensis* identificadas nos estados

de São Paulo e do Rio Grande do Sul (MOREIRA et al., 2007; VARGAS et al., 2007). Até o presente, foram confirmadas mais 5 espécies resistentes ao herbicida, sendo *Chloris polydactyla* (BRUNHARO et al., 2016), *Conyza sumatrensis* (SANTOS et al., 2014), *Digitaria insularis* (CARVALHO et al., 2011), *Eleusine indica* (TAKANO et al., 2017), e *Amaranthus palmeri* CARVALHO et al., 2015).

As primeiras populações de *Amaranthus palmeri* resistentes ao glyphosate foram identificadas no estado da Geórgia, Estados Unidos, em 2005 (CULPEPPER et al., 2006), sendo que essa identificação ocorreu em áreas de cultivos de algodão e soja com tolerância ao herbicida. Rapidamente foram identificadas populações de *A. palmeri* resistentes ao glyphosate também em outros estados ao sul do país, como Alabama, Arkansas, Carolina do Norte, Carolina do Sul e Mississippi e Tennessee (CULPEPPER et al., 2008; NORSWORTHY et al., 2008; STECKEL et al., 2008; HEAP, 2017). Embora o biótipo brasileiro possua a resistência, não foi selecionado no país, tendo sido introduzido já com essa característica (CARVALHO et al., 2015).

Ao contrário dos herbicidas inibidores da ALS, em que o mecanismo mais abundante são as mutações, para o glyphosate as mutações não são muito frequentes. Biótipos de 7 espécies – *Eleusine indica*, *Lolium multiflorum*, *Lolium rigidum*, *Digitaria insularis*, *Amaranthus tuberculatus*, *Echinochloa colona*, *Conyza canadensis* – possuem substituições por outros aminoácidos na Pro106, conferindo resistência ao herbicida, o mesmo mecanismo observado em *E. indica* no Brasil (HEAP, 2017; TAKANO et al., 2017; CARVALHO et al., 2012; JASIENIUK et al., 2008). A EPSPS é decodificada por uma região bastante conservada do genoma, e por isso as mutações na sequência genética da enzima são raras (PADGETTE et al., 1991).

As mutações na Pro106 geralmente resultam em níveis atenuados de resistência ao glyphosate (POWLES e YU, 2010). Alguns autores consideram que somente essa mutação não seria suficiente para explicar os níveis intermediários de resistência observados em algumas espécies. Pesquisas realizadas com substituições na Pro106 de *Escherichia coli* mostraram que essas mutações causam um ligeiro estreitamento na cavidade em que o glyphosate se liga, o que confere resistência ao herbicida, mas não impede a funcionalidade da enzima EPSPS por completo (HEALY-FRIED et al., 2007).

O custo adaptativo da resistência acontece quando uma mutação confere alterações na performance da planta, além de alterações na funcionalidade da enzima (VILA-AIUB et al., 2009). No geral, as substituições na Pro106 não resultam em *fitness* para as espécies que as possuem. No entanto, uma população de *E. indica* proveniente da Malásia é resistente ao

glyphosate possui dupla substituição na sequência de aminoácidos que constituem a EPSPS, sendo a Thr-102 (treonina a isoleucina) e Pro-106 (prolina a serina), conhecida como TIPS (YU et al., 2015; HAN et al., 2017). Essa dupla substituição foi um dos primeiros mecanismos de resistência ao glyphosate empregado em culturas tolerantes, como foi o caso do milho (SPENCER et al., 2000). A TIPS é decodificada por dois alelos distintos, conferindo elevado nível de resistência ($R/S > 182$) em relação ao biótipo suscetível (YU et al., 2015).

A dupla substituição na sequência da EPSPS ganhou atenção na comunidade científica devido ao potencial evolutivo da espécie de possuir duplo mecanismo e elevar o nível de resistência. Curiosamente, quando a dupla substituição está presente em homozigose reduz consideravelmente a habilidade competitiva de *E. indica*. De acordo com Han et al. (2017), plantas de *E. indica* com haplótipos RR para ambas as substituições (Thr102+Pro106 / Thr102+Pro106) apresentaram taxa de crescimento de 50% em comparação com biótipo suscetível, e redução de crescimento em 85% em situação de competição com a cultura do arroz, indicando o elevado custo adaptativo. No entanto, indivíduos heterozigotos, ou homozigotos somente para a Pro106 não têm o desempenho reduzido.

Além dos atributos genéticos, a resistência ao glyphosate também foi identificada como decorrente de fenômenos fisiológicos. O sequestro vacuolar, por exemplo, atribui a resistência ao herbicida em populações de buva (*C. canadensis*) (GE et al., 2010). Com isso, a molécula herbicida fica armazenada no vacúolo e impossibilitada de chegar ao cloroplasto e atingir seu sítio de ação, a enzima EPSPS. Ainda, Ge et al. (2011) observaram interferência da temperatura no mecanismo de resistência, sendo que as plantas resistentes mantidas no frio, não foram capazes de sobreviver ao herbicida. Isso corrobora o mecanismo do sequestro vacuolar, em que as baixas temperaturas reduzem a atividade do vacúolo, e fizeram com que o biótipo resistente tivesse esposta ao herbicida equivalente ao suscetível (GE et al., 2011).

Outros mecanismos limitam a quantidade do herbicida que atinge sua enzima-alvo, como a retenção foliar, absorção e translocação reduzidas. No Brasil, uma população de capim-branco (*C. polydactyla*) apresenta esses mecanismos de resistência. Brunharo et al. (2016) observaram diferença de 11.8% na taxa de absorção máxima do herbicida, translocação 27% inferior e retenção do herbicida na folha 23% superior, em relação ao biótipo suscetível. Outros exemplos de espécies que possuem esses mecanismos de resistência são a buva (*C. bonariensis*) e o capim-amargoso (*D. insularis*) (CARVALHO et al., 2012; CARDINALI et al., 2015).

Biótipos resistentes de *C. polydactyla* e *D. insularis* não apresentaram diferenças de crescimento e desenvolvimento em comparação com o biótipo suscetível (BRUNHARO,

2014; MELO, 2011). Moreira (2008) identificou menor crescimento de *C. canadensis*, relatando diferenças na habilidade competitiva por conta da resistência, mas não em *C. bonariensis*. No entanto, nesses biótipos de *C. canadensis* e *D. insularis* os mecanismos de resistência não foram elucidados. Assim, ressalta-se a importância de se conhecer o mecanismo envolvido com a resistência, uma vez que o isso irá suportar informações de como a evolução da resistência pode acontecer no campo, bem como as consequências para a dinâmica populacional e decisões de práticas de manejo mais apropriadas (MEROTTO JR. et al., 2010).

A resistência de plantas daninhas a herbicidas acarreta em mudanças necessárias ao sistema de produção, à medida que algumas moléculas ou mecanismos de ação herbicidas ficam impossibilitados de uso em devido à ineficácia sobre os biótipos resistentes (CHRISTOFFOLETI e LÓPEZ-OVEJERO, 2008). Normalmente, tais mudanças requerem a adoção de práticas que encarecem o custo de produção (CHRISTOFFOLETI e LÓPEZ-OVEJERO, 2008). Nesse sentido, Mueller et al. (2005) descrevem a aumento nos custos de produção após o surgimento da resistência, e ainda destacam a importância do manejo proativo, ou seja, anterior ao surgimento de populações resistentes e, conseqüentemente, prévio à ineficácia de moléculas devido à problemática da resistência (MUELLER et al., 2005).

Além das espécies resistentes, o glifosato não possui eficácia no controle de algumas espécies que apresentam tolerância, tais como *Commelina benghalensis*, *Ipomoea* spp., *Borreria* spp. e *Richardia brasiliensis*. Tolerância, por sua vez, é a capacidade inata da espécie de sobreviver a determinada dose do herbicida, não havendo suscetibilidade da espécie, ou seja, o biótipo selvagem possui a capacidade de sobreviver ao herbicida (CHRISTOFFOLETI e LÓPEZ-OVEJERO, 2008).

Para áreas de produção com presença de plantas daninhas resistentes, recomenda-se a rotação de culturas e de mecanismos de ação herbicida utilizados (CHRISTOFFOLETI e LÓPEZ-OVEJERO, 2008). Além disso, práticas culturais devem ser incorporadas ao sistema, como o uso de culturas de coberturas ou até mesmo o cultivo simultâneo com espécies forrageiras, uma vez que reduz a pressão de herbicidas, fluxos de emergência de plantas daninhas e o sucesso de estabelecimento de daninhas por aumento da matocompetição (NORSWORTHY et al., 2012). A utilização de herbicidas pré-emergentes é de fundamental importância, bem como misturas de herbicidas e aplicações sequenciais em pós emergência, para impedir o fluxo elevado de emergência e a obtenção de elevados índices de controle ao longo de todo o ciclo da cultura. A adoção dessas práticas normalmente quer maiores

investimentos, desafiando a sustentabilidade da produção agrícola (CHRISTOFFOLETI e LÓPEZ-OVEJERO, 2008).

Embora o primeiro caso de *A. palmeri* resistente ao glyphosate tenha sido identificado em 2005 (CULPEPPER et al., 2006), o mecanismo de resistência da espécie não foi inicialmente identificado. Gaines et al. (2010) confirmaram que a resistência a glyphosate em *A. palmeri* é decorrente da amplificação gênica, mecanismo em que a planta possui diversas cópias do gene que codifica a enzima EPSPS. Dessa forma, a quantidade do herbicida normalmente utilizada não é suficiente para inibir a atividade enzimática, e a planta mantém seu metabolismo em funcionamento.

Os objetivos dessa seção foram determinar o nível de resistência do biótipo brasileiro de *A. palmeri* ao herbicida glyphosate, em comparação com um biótipo suscetível, bem como confirmar o mecanismo de resistência, como previamente relatado na literatura.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Curvas de dose resposta

Dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação pertencente ao laboratório de Pesquisas de Plantas Daninhas da Colorado State University, em Fort Collins, CO, para quantificar o nível da resistência ao glyphosate. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com três repetições. Cada repetição foi composta de seis indivíduos de cada população e dose. Na segunda corrida experimental, cada repetição foi composta de quatro indivíduos para cada população e dose.

As sementes de *A. palmeri* de ambas as populações, BR-R e GA-S, foram dispostas em gel de agarose a 1% e alocadas em refrigerador a 4 °C por 7 dias. Após essa etapa, foram transferidas para banco de germinação à temperatura ambiente a 12/12 h de luz/luz para estimular que a germinação das sementes fosse rápida e simultânea. As plântulas foram transplantadas em potes de tamanho 5x5 cm com substrato comercial de casca de pinus.

A aplicação dos tratamentos foi feita quando as plantas estavam entre 8 e 10 cm de altura. Após a aplicação dos tratamentos, as plantas foram mantidas em casa de vegetação a temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 15/9 h dia/noite suplementadas com iluminação artificial (lâmpadas de iodetos metálicos $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e irrigadas duas vezes ao dia para manter as plantas sem restrições de suprimento hídrico.

As curvas de dose resposta foram conduzidas utilizando-se como tratamentos as doses de 0, 0,05, 0,08, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, e 4,8 kg de glyphosate ha⁻¹ com formulação comercial de sal de potássio (Roundup Weather Max, Monsanto Co., St. Louis, MO). Na repetição do experimento, a dose de 8 kg glyphosate ha⁻¹ foi incluída aos tratamentos.

A aplicação dos tratamentos foi feita em câmara de pulverização equipada com bicos TeeJet de abertura em leque do tipo 8002 EVS, regulada para distribuir 187 L ha⁻¹ à pressão de 172 kPa. Os dados de sobrevivência foram coletados 21 dias após aplicação, com base no crescimento de tecidos novos/meristemáticos. As curvas de dose-resposta foram construídas utilizando-se o pacote “drc” do programa R (Knezevic et al., 2007). Os dados de sobrevivência foram analisados utilizando equação modelo log-logístico de três parâmetros disponível no pacote “drc”.

$$y = \frac{D}{1 + \left(\frac{x}{LD_{50}} \right)^b}$$

Em que: y = sobrevivência; x = dose de glyphosate (g a.e. ha⁻¹); D = limite superior; b = declividade; e DL₅₀ = dose que resulta em 50% da variável resposta (sobrevivência).

5.2.2 Acúmulo de chiquimato nos biótipos BR-R e GA-S

O teste de acúmulo de ácido chiquímico também pode ser conduzido para verificar diferenças na suscetibilidade ao glyphosate entre diferentes biótipos. Nesse experimento, vinte plantas de cada biótipo (BR-R e GA-S) foram cultivadas em casa de vegetação e testadas para a resistência a glyphosate com experimento de disco foliar in vivo.

Três repetições técnicas (da mesma planta) de cada indivíduo por população foram amostradas seguindo o procedimento descrito por Shaner et al. (2005). Os discos foliares foram dispostos em placas contendo 96 poços, sendo adicionados 10 mM de solução tampão com fosfato de amônio e glyphosate nas doses de 100, 500 e 1000 µM. Os níveis de chiquimato foram lidos a 380 nm em leitor fluorescente (BioTek™ Synergy™ 2 multi-mode microplate reader, Winooski, VT). A curva padrão de chiquimato foi utilizada para quantificar o acúmulo (ng chiquimato µL⁻¹) nas amostras. Os dados foram analisados utilizando-se o teste t para comparar a resposta entre os biótipos BR-R e GA-S.

5.2.3 Mecanismo de resistência ao glyphosate: aumento no número de cópias do gene que codifica a EPSPS

O DNA genômico foi utilizado para determinar o número de cópias da 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase (EPSPS), utilizando-se PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Vinte indivíduos de cada biótipo (BR-R e GA-S) foram cultivados em potes pequenos, e o tecido vegetal foi retirado de cada planta para coleta de DNA genômico. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. A extração do DNA foi feita utilizando-se Qiagen DNEase Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) e quantificadas usando espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE). As concentrações de DNA foram ajustadas a 5 ng μl^{-1} e os *primers* e a qPCR foram utilizados conforme condições previamente descritas (ALSF2, ALSR2, EPSF1 e EPSR8). Os ciclos limite (Ct) para a EPSPS e ALS foram gravados pelo termociclador CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). O número de cópias relativas do gene da EPSPS foi calculado com $2^{-\Delta\text{Ct}}$, sendo $\Delta\text{Ct} = [(\text{Ct, ALS}) - (\text{Ct, EPSPS})]$ (GAINES et al., 2010). Cópias técnicas triplicadas foram utilizadas para calcular a média e erro padrão do aumento de cópias da EPSPS em relação à ALS. Os resultados foram expressos em proporções de aumento de cópias da EPSPS em relação à ALS.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Curvas de dose-resposta

A resistência ao glyphosate foi observada em ambos os experimentos. A dose para atingir mortalidade de 50% das plantas (DL_{50}) para GA-S no primeiro experimento foi de 274 g e.a. ha^{-1} , enquanto para BR-R foi de 4.426 g e.a. ha^{-1} , resultando num fator de resistência (R/S) de 16 (Tabela 5.1, Figura 5.1). Os resultados foram confirmados no segundo experimento, com a DL_{50} de 68 g e.a. ha^{-1} e 3.400 g e.a. ha^{-1} para GA-S e BR-R, respectivamente, com R/S de 50 (Tabela 5.1, Figura 5.1). Esses valores de DL_{50} e de fatores de resistência confirmam a resistência da população brasileira de *A. palmeri* ao glyphosate e demonstra que BR-R possui DL_{50} superior ao dobro da dose comercial de glyphosate tipicamente utilizada (variando entre 800 a 1000 g e.a. ha^{-1}).

Culpepper et al. (2006) observaram controle de 50% da população do biótipo suscetível com 0,15 kg ha^{-1} de glyphosate, quando identificaram pela primeira vez um biótipo

resistente no estado da Geórgia, sendo para este o valor foi de 1,3 kg de glyphosate ha⁻¹ para controle de 50% da população, 8 vezes superior. Ainda, esses autores observaram controle total do biótipo suscetível com 0,6 kg ha⁻¹, enquanto para o biótipo resistente foram necessários 7,2 kg de glyphosate ha⁻¹, dose economicamente impraticável.

Figura 5.1 – Curvas de dose-resposta em casa-de-vegetação para populações do Brasil (BR-R, círculos) e Geórgia (GA-S, triângulos) expressos em proporção de sobrevivência; A, experimento 1; B, experimento 2.

Tabela 5.1 – Resistência de *A. palmeri* procedente do Brasil (BR-R) em comparação com uma população suscetível conhecida procedente da Geórgia (GA-S) em duas curvas de dose-resposta em casa-de-vegetação. Fort Collins, CO, 2018.

Experimento	Biótipo	D ¹	DL ₅₀ ²	B ³	R/S ⁴	P valor
1	BR-R	1.0	4426	2.8	16	<0.0001
	GA-S	0.97	274	3.2		
2	BR-R	1.0	3400	3.1	50	<0.0001
	GA-S	0.98	68	1.6		

1: limite superior; 2: dose herbicida em g a.e. ha⁻¹ que proporciona 50% para a variável resposta (mortalidade); 3: declividade; 4: relação entre DL₅₀ do BR-R e GA-S expresso como fator de resistência (R/S).

No Tennessee, os primeiros relatos de *A. palmeri* resistente ao glyphosate apresentaram fator de resistência variando entre 1,5 e 5, baseado na biomassa, para populações de diferentes locais (STECKEL et al., 2008). Norsworthy et al. (2008) observaram maior índice de resistência no estado do Arkansas, com biótipos suscetíveis apresentando

DL₅₀ de 24,4 a 35,5 g e.a. de glyphosate ha⁻¹, enquanto o biótipo resistente precisou de 2.820 g e.a. ha⁻¹, com fator de resistência de 79 a 115, e dose de glyphosate 3,4 vezes superior a recomendada (840 g e.a. ha⁻¹).

Alguns anos após os primeiros relatos, novos estudos foram feitos avaliando a resistência múltipla de *A. palmeri* a glyphosate e herbicidas inibidores da ALS em populações de *A. palmeri*. Na Geórgia, a dose estimada para controlar 50% das populações dessa vez foram 1.450 e 1.102 g ha⁻¹, 16 e 12 vezes superior à dose para mesmo controle do biótipo suscetível (91 a 103 g ha⁻¹) (SOSNOSKIE et al., 2011). Nandula et al. (2012) observara que a dose para redução de crescimento em 50% em biótipos provenientes do Mississippi foram 1.52 e 1.3 kg e.a. ha⁻¹ para os resistentes e 0,09 kg e.a. ha⁻¹ para o suscetível, com R/S de 17 e 14, respectivamente. Isso indica que biótipos com índices de resistência ao glyphosate mais elevados podem ser selecionados com o uso repetitivo do herbicida ao longo dos anos.

Carvalho et al. (2015) encontraram DL₅₀ de 1448,85 g ha⁻¹, obtendo um fator de resistência de 13,77 para o biótipo brasileiro de *A. palmeri* – devido a ausência do biótipo suscetível no País, os autores recorreram a revisão de literatura para DL₅₀ de *A. palmeri* suscetível, encontrando valor médio de 105,2 g ha⁻¹. Os dados do presente estudo corroboram as conclusões previamente feitas por Carvalho et al. (2015).

5.3.2 Acúmulo de chiquimato nos biótipos BR-R e GA-S

O chiquimato é um composto intermediário importante na biossíntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano. A inibição da EPSPS pelo glyphosate leva ao acúmulo de chiquimato nas plantas suscetíveis (HERMANN E WEAVER, 1999; SHANER et al., 2005).

Os dados de cada biótipo estão dispostos em barras (Figura 5.2), juntamente com os desvios padrões. Assim, é possível identificar uma clara diferença no acúmulo de chiquimato entre os biótipos BR-R e GA-S nas três doses de glyphosate utilizadas, 100, 500 e 1000 µM, com GA-S apresentando acúmulo significativamente superior ao BR-R. Ainda, o incremento nas doses de glyphosate, até 1000 µM, não resultou acúmulo de chiquimato em BR-R, sendo, assim, um indicador metabólico da resistência ao herbicida.

A ausência de acúmulo de chiquimato no biótipo BR-R corroboram os resultados obtidos com as curvas de dose-resposta (Tabela 5.1, Figura 5.1), ambos confirmando a resistência a glyphosate em BR-R. Esses resultados confirmam as conclusões de Carvalho et

al. (2015) reportando a resistência desta população de *A. palmeri* proveniente do estado do Mato Grosso, Brasil.

Figura 5.2 – Acúmulo de chiquimato em *A. palmeri* resistente a glyphosate (BR-R) e suscetível (GA-S) em três doses. Médias de 20 repetições biológicas com desvio padrão; **** indica p-valor < 0.0001 entre GA-S e BR-R para cada dose.

5.3.3 Mecanismo de resistência à EPSPS: aumento no número de cópias do gene

A técnica da qPCR foi utilizada para quantificar o número de cópias do gene da EPSPS relativas à ALS. O biótipo GA-S apresentou 1,1 e 1,5 cópias da EPSPS relativas à ALS, enquanto BR-R apresentou entre 50 e 179 cópias. O aumento no número de cópias da EPSPS está altamente relacionado com a redução do acúmulo de chiquimato nos indivíduos BR-R, enquanto no GA-S, biótipo selvagem, resulta no acúmulo do composto devido à cópia única da EPSPS (Figura 5.3). Indivíduos da população BR-R tem genes duplicados da EPSPS, que resulta na superexpressão como mecanismo de resistência, conforme previamente relatado em *A. palmeri* (GAINES et al., 2010).

Figura 5.3 – Cópias genômicas relativas da EPSPS e acúmulo de chiquimato após tratamento de discos foliares com 1000 μ M glyphosate em caruru-palmeri resistente a glyphosate procedente do Brasil (BR-R) e suscetível da Geórgia (GA-S).

Em estudos anteriores, uma população de *A. palmeri* da Geórgia resistente a glyphosate tinha DL_{50} de 1.600 g e.a. ha^{-1} e entre 40 e 100 cópias relativas do gene da EPSPS (GAINES et al., 2011). O biótipo brasileiro (BR-R) tem valores de DL_{50} de 4.426 e 3.400 g e.a. ha^{-1} (Tabela 5.1) e duplicação de genes da EPSPS com número de cópias entre 50 e 179, indicando que esse seja o mecanismo de resistência ao glyphosate presente no biótipo brasileiro de *A. palmeri*.

A amplificação gênica é conhecida por atribuir resistência a inseticidas em insetos, previamente à sua identificação em plantas. Pernilongos dos gêneros *Culex* e *Myzus* possuem amplificações em sequência de genes de metabolismo, conferindo resistência a inseticidas organofosfatados, de forma que os pernilongos resistentes possuem aproximadamente 80 vezes mais cópias desse gene que os suscetíveis (PATON et al., 2000; FIELD et al., 1997).

Após o relato em *A. palmeri*, a amplificação gênica da EPSPS foi identificada também em outras espécies, como *L. perene* spp. *multiflorum* (SALAS et al., 2012), *A.*

tuberculatus (CHATAM et al., 2015a; CHATAM et al., 2015b; LORENTZ et al., 2014), *Bromus diandrus* (MALONE et al., 2016), *Kochia scoparia* (WIERSMA et al., 2015) e *E. indica* (CHEN et al., 2015). A amplificação gênica também foi observada em *A. spinosus*, porém como decorrência de hibridação com *A. palmeri* resistente (NANDULA et al., 2014). Isso indica que a duplicação gênica é um mecanismo de resistência ao glyphosate comum em espécies de plantas daninhas, possivelmente sendo mais frequente que substituições na sequência da EPSPS.

Recentemente, a amplificação gênica foi identificada em *Digitaria sanguinalis* conferindo resistência a inibidores da enzima acetil-coenzima-a carboxilase (ACCase), em que o biótipo resistente apresentou entre 3,4 e 9,3 cópias do gene que codificam a enzima em relação ao biótipo suscetível (LAFOREST et al., 2017). Dessa forma, é possível observar que a identificação desse mecanismo de resistência por Gaines et al. (2010) teve grande importância para mais aplicações na área de estudo. Embora esse mecanismo fosse conhecido por conferir resistência a inseticidas, não havia sido relatado como mecanismo de resistência a herbicidas até então.

A amplificação gênica conferindo resistência a herbicidas foi uma das maiores descobertas da ciência das plantas daninhas nos últimos anos (TRANDEL et al., 2017). Laforest et al. (2017) apontam que diversos casos de resistência a inibidores da ACCase não foram elucidados, sugerindo que a amplificação possa estar presente em diversas espécies. Em insetos, é comum a duplicação estar relacionada a genes que não são alvos diretos dos inseticidas, ou seja, genes relacionados a metabolismo, ao contrário do comumente observado – superexpressão gênica de enzimas-alvo de inseticidas e herbicidas – o que também pode acontecer em plantas daninhas, embora ainda não tenha sido observado (TRANDEL, 2017).

O aumento no número de cópias da EPSPS tem sido extensivamente estudado em plantas resistentes desde a sua descoberta, e correlaciona com os níveis de resistência quando comparado com plantas do biótipo suscetível, com menor número de cópias (GAINES et al., 2010). Espécies diferentes podem necessitar de número diferentes de cópias da EPSPS para que isso atribua resistência ao glyphosate. Gaines et al. (2010, 2011), observaram que 30 a 50 cópias da enzima são suficientes para que populações sobrevivam a dose recomendada do herbicida em *A. palmeri*. Para a *Kochia scoparia*, entre 3 e 10 cópias são necessárias para resultar na sobrevivência à mesma dose de glyphosate (JUGULAM et al. 2014; WIERSMA et al. 2015).

O *A. palmeri* possui as cópias da EPSPS espalhadas por todos os cromossomos da planta, sendo que esse padrão de dispersão das cópias pelo genoma pode ser facilitado por

elementos de transposição (GAINES, et al. 2010). Gaines et al. (2013) identificaram elementos de transposição pequenos e repetidos próximos ao gene que codifica a EPSPS. Este estudo também identificou ativadores e sequências associadas a transposons próximos às sequências da EPSPS, sugerindo o envolvimento desses elementos com a distribuição das cópias duplicadas da enzima pelo genoma das plantas resistentes (GAINES et al., 2013).

Com o número massivo de cópias da EPSPS, a probabilidade de haver polimorfismos na sequência codificante é elevada. No entanto, não foram observadas mutações que conferem resistência ao glyphosate em sequências da EPSPS de *A. palmeri* resistente (GAINES et al., 2010). Os autores observaram a substituição de uma Lisina por uma Arginina na posição 316 em plantas resistentes, porém, a mesma substituição foi observada em plantas suscetíveis, sugerindo que essa substituição não é responsável por atribuir resistência ao glyphosate (GAINES et al., 2010).

Elevados índices de resistência ao glyphosate estão correlacionados com maior número de cópias da EPSPS, enquanto níveis inferiores, com menor número (VILA-AIUB et al., 2014). Mesmo com a ausência de mutações na sequência genética da EPSPS, a amplificação gênica poderia resultar em *fitness* para a espécie, devido ao custo metabólico de superprodução da enzima ou à disrupção de genes após a inserção do gene da EPSPS. Porém, plantas de *A. palmeri* com maior número de cópias da EPSPS apresentam o mesmo desempenho de crescimento e desenvolvimento que plantas suscetíveis (GIACOMINI et al., 2014; VILA-AIUB et al., 2014). O uso contínuo do glyphosate pode resultar em aumento proporcional dos alelos de resistência dentro de uma população, à medida que seleciona os indivíduos resistentes. Porém, a ausência do custo adaptativo indica a possibilidade de o *trait* de resistência persistir através das gerações, indicando risco de inviabilidade no uso do glyphosate como ferramenta de controle de *A. palmeri* a longo prazo em áreas altamente infestadas, mesmo sem o uso frequente do herbicida (GIACOMINI et al., 2014).

Dessa forma, está claro que o *A. palmeri* é uma espécie de alta capacidade de sucesso evolutivo, dados os elevados níveis de resistência e a ausência do custo adaptativo por conta da resistência ao glyphosate. Além dos outros aspectos discutidos, os riscos de hibridação e transferência da resistência com outras espécies do gênero *Amaranthus* podem intensificar a problemática da resistência (GAINES et al., 2012; NANDULA et al., 2014). Portanto, *A. palmeri* é uma espécie que merece atenção redobrada, e ressalta-se a importância do monitoramento constante nas áreas infestadas no estado do Mato Grosso, visando sua contenção.

5.4 Conclusões

O biótipo de *A. palmeri* introduzido no Brasil possui elevado índice de resistência ao herbicida glyphosate, sendo a dose do herbicida necessária para controle de 50% da população entre 3.400 e 4.426 g e.a. ha⁻¹, atribuindo ao biótipo fator de resistência de 16 a 50, em comparação com biótipo suscetível.

Em bioensaio de discos foliares, o biótipo brasileiro (BR-R) não apresentou acúmulo de chiquimato para as três doses de glyphosate utilizadas, 100, 500 e 1000 µM, correspondendo com o observado em plantas resistentes e corroborando os resultados dos experimentos realizados em estufa.

O mecanismo de resistência presente no biótipo brasileiro é decorrente do aumento no número de cópias da EPSPS decorrente da amplificação do gene que codifica a enzima, sendo observados número de cópias entre 50 e 179, conferindo alto nível de resistência.

Referências bibliográficas

BORÉM, A.; SANTOS, F. R. Variedades Resistentes a Herbicidas: Legislação e liberação. In: **A ciência das plantas daninhas na sustentabilidade dos sistemas agrícolas. XXVI CBCPD/ XVIII Congreso ALAM.** p.165-178, 2008.

BOUDET, A.M.; GRAZIANA, A.; RANJEVA, R. Recent advances in the regulation of the prearomatic pathway. In: VAN SUMERE, C.F.; LEA, P.J. (Eds.) **Biochemistry of plant phenolics.** Oxford: Claredon Press, p. 135-159, 1985.

BRUNHARO, C.A.C.G.; PATTERSON, E.L.; CARRIJO, D.R.; MELO, M.S.C.; GAINES, T.A.; NISSEN, S.J.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Confirmation and mechanism of glyphosate resistance in tall windmill grass (*Chloris elata*) from Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, p. 1758-1764, 2016.

BRUNHARIO, C.A.G.C. **Resistência da planta daninha capim-branco (*Chloris polydactyla*) ao herbicida glyphosate.** 2014. 153 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

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

CARVALHO, L.B.C.; CRUZ-HIPOLITO, H. GONZALEZ-TORRALVA, F; ALVES, P.L.C.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.C.; PRADO, R. Detection of sourgrass (*Digitaria insularis*) biotypes resistant to glyphosate in Brazil. **Weed Science**, v. 59, p. 171-176, 2011.

CARVALHO, S.J.P.; GONÇALVES NETTO, A.; NICOLAI, M.; CAVENAGHI, A.L.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Detection of glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) in agricultural areas of Mato Grosso, Brazil. **Planta Daninha**, v. 33, p. 579-586, 2015.

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

CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Resistência de Plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no Mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Ed.) **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3ª Edição. Campinas: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas Daninhas aos Herbicidas (HRAC-BR), 2008. 120p.

CHATHAM, L.A.; BRADLEY, K.W.; KRUGER, G.R.; MARTIN, J.R.; OWEN, M.D.; PETERSON, D.E.; MITHILA, J.; TRANEL, P.J. A multistate study of the association between glyphosate resistance and EPSPS gene amplification in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). **Weed Science**, v. 63, p. 569-577, 2015a.

CHATHAM, L.A.; WU, C.; RIGGINS, C.W.; HAGER, A.G.; YOUNG, B.G.; ROSKAMP, G.K.; TRANEL, P.J. EPSPS gene amplification is present in the majority of glyphosate-resistant Illinois waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) populations. **Weed Technology**, v. 29, p. 48-55, 2015b.

CHEN, J.; HUANG, H.; ZHANG, C.; WEI, S.; HUANG, Z.; CHEN, J.; WANG, X. Mutations and amplification of EPSPS gene confer resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*). **Planta**, v. 242, p. 859-868, 2015

CULPEPPER, A.S.; GREY, T.L.; VENCILL, W.K.; KICHLER, J.M.; WEBSTER, T.M.; BROWN, S.M.; YORK, A.C.; DAVIS, J.W.; HANNA, W.W. (2006) Glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) confirmed in Georgia. **Weed Science**, v. 54, p. 620-626, 2006.

CULPEPPER, A.S.; WHITAKER, J.R.; MACRAE, A.W.; YORK, A.C. Distribution of glyphosate-resistant Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*) in Georgia and North Carolina during 2005 and 2006. **The Journal of Cotton Science**, v. 12, p. 306-310, 2008.

DILL, G.M.; CAJACOB, C.A.; PADGETTE, S.R. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. **Pest Management Science**, v. 64, p. 326-331, 2008.

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

DYER, W.E. Resistance to glyphosate. In: POWLES, S.B.; HOLTUM, J.A.M. (Eds) **Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry**. Boca Raton, Lewis Publisher. p. 229-242, 1994.

ELMORE, R.W.; ROETH, F.W.; NELSON, L.A.; SHAPIRO, C.A.; KLEIN, R.N.; KNEZEVIC, S.Z.; MARTIN, A. Glyphosate-resistant soybean cultivar response to glyphosate. **Agronomy Journal**, v.93, p.408-412, 2001.

ESCHENBURG S, HEALY ML, PRIESTMAN MA, LUSHINGTON GH, SCHÖNBURN E. How the mutation glycine96 to alanine confers glyphosate insensitivity to 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. **Planta**, v. 216, p. 129-135, 2002.

FERREL, J.A.; WITT, W.W. Comparison of glyphosate with other herbicides for weed control in corn (*Zea mays*): efficacy and economics. **Weed Technology**, v.16, p.701-706, 2002.

FIELD, L.M.; DEVONSHIRE, A.L. Structure and organization of amplicons containing the E4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). **Biochemistry Journal**, v. 322, p. 867–871, 1997.

GAINES, T.A.; SHANER, D.L.; WARD, S.M.; LEACH, J.E.; PRESTON, C.; WESTRA, P. Mechanism of resistance of evolved glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5886-5889, 2011.

GAINES, T.A.; WARD, S.M.; BUKUN, B.; PRESTON, C.; LEACH, J.E.; WESTRA, P. Interspecific hybridization transfers a previously unknown glyphosate resistance mechanism in *Amaranthus* species. **Evolutionary Applications**, v. 5, p. 29-38, 2012.

GAINES, T.A.; WRIGHT, A.A.; MOLIN, W.T.; LORENTZ, L.; RIGGINS, C.W.; TRANEL, P.J.; BEFFA, R.; WESTRA, P.; POWLES, S.B. Identification of genetic elements associated with EPSPS gene amplification. **PLOS ONE**, v. 8, 2013.

GAINES T.A.; ZHANG, W; WANG, D.; BUKUN, B.; CHISHOLM, S.T.; SHANER, D.L.; NISSEN, S.J.; PATZOLDT, W.L.; TRANEL, P.J.; CULPEPPER, A.S.; GREY, T.L.; WEBSTER, T.M.; VENCILL, W.K.; SAMMONS, R.D.; JIANG, J.M.; PRESTON, C.; LEACH, J.E.; WESTRA, P. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 107, p. 1029-1034, 2010.

GE, X.; D'AVIGNON, D.A.; ACKERMAN, J.J.H.; DUNCAN, B.; SPAUR, M.B.; SAMMONS, R.D. Glyphosate-resistant horseweed made sensitive to glyphosate: low-temperature suppression of glyphosate vacuolar sequestration revealed by ³¹P NMR. **Pest Management Science**, v. 67, p. 1215-1221, 2011.

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

GIACOMINI, D.; WESTRA, P.; WARD, S.M. Impact of genetic background in fitness cost studies: An example from glyphosate-resistant Palmer amaranth. **Weed Science**, v. 62, p. 29-37, 2014.

GREEN, J. The benefits of herbicide-resistant crops. **Pest Management Science**, v. 68, p. 1323-1331, 2012.

HAN, H.; VILA-AIUB, M.M.; JALALUDIN, A.; YU, Q.; POWLES, S.B. A double EPSPS gene mutation endowing glyphosate resistance shows a remarkably high resistance cost. **Plant, Cell and Environment**, v. 40, p. 3031-3042, 2017.

HEALY-FRIED, M.L.; FUNKE, T.; PRIESTMAN, M.A.; HAN, H.; SCHONBURN, E. Structural basis of glyphosate tolerance resulting from mutations of Pro101 in *E. coli* EPSP synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 32949-32955, 2007.

HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. Disponível em: www.weedscience.org. Acesso em: 01/12/2017.

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

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

JOHNSON, W.G.; BRADLEY, P.R.; HART, S.E.; BUESINGER, M.L.; MASSEY, R.E. Efficacy and economics of weed management in glyphosate-resistant corn (*Zea mays*). **Weed Technology**, v.14, p.57-65, 2000.

JUGULAM, M.; NIEHUES, K.; GODAR, A.S.; KOO, D.H.; DANILOVA, T.; FRIEBE, B.; SEHGAL, S.; VARANASI, V.K.; WIERMSMA, A.; WESTRA, P.; STAHLMAN, P.W.; GILL, B.S. Tandem amplification of a chromosomal segment harboring 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase locus confers glyphosate resistance in *Kochia scoparia*. **Plant Physiology**, v. 166, p. 1200-1207, 2014.

KNEZEVIC, S.Z.; STREIBIG, J.C.; RITZ, C. Utilizing R software package for dose-response studies: the concept and data analysis. **Weed Technology**, v. 21, p. 840-848, 2007.

LAFOREST, M.; SOUFIANE, B.; SIMARD, M.J.; OBEID, K.; PAGE, E.; NURSE, R.E. Acetyl-coA carboxylase overexpression in herbicide-resistant large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*). **Pest Management Science**, v. 73, p. 2227-2235, 2017

LORENTZ, L.; GAINES, T.A.; NISSEN, S.J.; WESTRA, P.; STREK, H.; DEHNE, H.W.; RUIZ-SANTELLA, J.P.; BEFFA, R. Characterization of glyphosate resistance in *Amaranthus tuberculatus* populations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 8134-8142, 2014.

MALONE, J.M.; MORRAN, S.; SHIRLEY, N.; BOUTSALIS, P.; PRESTON, C. EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant *Bromus diandrus*. **Pest Management Science**, v. 72, p. 81-88, 2016.

MELO, M.S.C. **Alternativas de controle, acúmulo de chiquimato e curva de crescimento de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) suscetível e resistente ao glyphosate**. 2011. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

MEROTTO JR., A.; KUPAS, V.R.; NUNES, A.L.; GOULART, I.C.G.R. Isolamento do gene ALS e investigação do mecanismo de resistência a herbicidas em *Sagittaria montevidensis*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 11, p. 2381-2384, 2010.

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

MOREIRA, M.S.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S.J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Resistência de *Conyza canadensis* e *C. bonariensis* ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 25, p. 157-164, 2007.

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

NANDULA, V.K.; REDDY, K.N.; KOGER, C.H.; POSTON, D.H.; RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O.; BOND, J.A.; RIBEIRO, D.N. Multiple resistance to glyphosate and pyithiobac in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) from Mississippi and response to flumiclorac. **Weed Science**, v. 60, p. 179-188, 2012.

NANDULA, V.K.; WRIGHT, A.A.; OND, J.A.; RAY, J.D.; EUBANK, T.W.; MOLIN, W.T. EPSPS amplification in glyphosate-resistant spiny amaranth (*Amaranthus spinosus*): a case of gene transfer via interspecific hybridization from glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). **Pest Management Science**, v. 70, p. 1902-1909, 2014.

NOLTE, S.A.; YOUNG, B.G. Efficacy and economic return on investment for conventional and herbicide-resistant corn (*Zea mays*). **Weed Technology**, v.16, p.371-378, 2002.

NORSWORTHY, J.K.; GRIFFITH, G.M.; SCOTT, R.C.; SMITH, K.L.; OLIVER, L.R. Confirmation and control of glyphosate-resistant Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*) in Arkansas. **Weed Technology**, v. 22, pg. 108-113, 2008.

NORSWORTHY, J.K.; WARD, S.M.; SHAW, D.R.; LLEWELLYN, R.S.; NICHOLS, R.L.; WEBSTER, T.M.; BRADLEY, K.W.; FRISVOLD, G.; POWLES, S.B.; BURGOS, N.R.; WITT, W.W.; BARRETT, M. Reducing the risks of herbicide resistance: best management practices and recommendations. **Weed Science**, v. 60, p. 31-62, 2012.

OWEN, M.K.; ZELAYA, I.A. Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. **Pest Management Science**, v. 61, p. 301-311, 2005.

PADGETTE, S.R.; RE, D.B.; GASSER, C.S.; EICHHOLTS, D.A.; FRAZIER, R.B.; HIRONAKA, C.M.; LEVINE, E.B.; SHAH, D.M.; FRALEY, R.T.; KISHORE, G.M. Site-directed mutagenesis of a conserved region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase active site. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 22364-22369, 1991.

PATON, M.G.; KARUNARATNE, S.H.; GIAKOUMAKI, E.; ROBERTS, N.; HEMINGWAY, J. Quantitative analysis of gene amplification in insecticide-resistant *Culex* mosquitoes. **Biochemical Journal**, v. 346, p.17–24, 2000.

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

POWLES, S.B.; LORRAINE-COLWILL, D.F.; DELLOW, J.J. PRESTON, C. Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. **Weed Science**, v. 46, p. 604-607, 1998.

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

ROMAN, E.S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M.A.; MATTEI, R.W. Resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 22, p. 301-306, 2004.

SALAS, R.A.; DAYAN, F.E.; PAN, Z.; WATSON, S.B.; DICKSON, J.W.; SCOTT, R.C.; BURGOS, N.R. EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) from Arkansas. **Pest Management Science**, v. 68, p. 1223-1230, 2012.

SANTOS, G.; OLIVEIRA JR., R.S.; CONSTANTIN, J.; FRANCISCHINI, A.C.; MACHADO, M.F.P.S.; MANGOLIN, C.A.; NAKAJINA, J.N. *Conyza sumatrensis*: a new weed species resistant to glyphosate in the Americas. **Weed Biology and Management**, v. 14, p. 106-114, 2014.

SCHONBURN, E.; ESCHENBURG, S.; SHUTTLEWORTH, W.A.; SCHLOSS, J.V.; AMRHEIN, N.; EVANS, J.N.; KABSCH, W. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in atomic detail. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 98, p. 1376-80, 2001.

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

SOSNOSKIE, L.M.; KICHLER, J.M.; WALLACE, R.D.; CULPEPPER, A.S. Multiple resistance in Palmer amaranth to glyphosate and pyriproxyfen confirmed in Georgia. **Weed Science**, v. 59, p. 321-325, 2011.

SPENCER, M.; MUMM, R.; GWYN, J.; DEROSE, R.; FREYSSINET, G.; LEBRUN, M.; LEROUX, B.; SAILLAND, A. Inventors. **Glyphosate resistant maize lines**. Dekalb Genetics Corporation: US 6,040,497. p. 1-59, 2000.

STECKEL, L.E.; MAIN, C.L.; ELLIS, A.T.; MUELLER, T.C. Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) in Tennessee has low level glyphosate resistance. **Weed Technology**, v. 22, p. 119-123, 2008.

TAKANO, H.K.; OLIVEIRA JR., R.S.; CONSTANTIN, J.; BRAZ, G.B.P.; GHENO, E.A. Goosegrass resistant to glyphosate in Brazil. **Planta Daninha**, v. 35, p. 1-9, 2017.

TRANDEL, P.J. Herbicide-resistance mechanisms: gene amplification is not just for glyphosate. **Pest Management Science**, v. 73, p. 2225-2226, 2017.

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

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

VILA-AIUB, M.M.; GOH, S.S.; GAINES, T.A.; HAN, H.; BUSI, R.; YU, Q.; POWLES, S.B. No fitness cost of glyphosate resistance endowed by massive EPSPS gene amplification in *Amaranthus palmeri*. **Planta**, v. 239, p. 793-901, 2014.

VILA-AIUB, M.M.; NEVE, P.; POWLES, S.B. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. **New Phytologist**, v. 184, p. 751-767, 2009.

WIERSMA, A.T.; GAINES, T.A.; PRESTON, C.; HAMILTON, J.P.; GIACOMINI, D.; BUELL, C.R.; LEACH, J.E.; WESTRA, P. Gene amplification of 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase in glyphosate-resistant *Kochia scoparia*. **Planta**, v. 241, p. 463-474, 2015.

YU, Q.; JALALUDIN, A.; HAN, H.; CHEN, M.; SAMMONS, R.D.; POWLES, S.B. Evolution of a double amino acid substitution in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Eleusine indica* conferring high-level glyphosate resistance. **Plant Physiology**, v. 167, p. 1440–1447, 2015.

6. CONTROLE QUÍMICO DE *Amaranthus palmeri* BASEADO NO USO DAS CULTURAS GENETICAMENTE MODIFICADAS COM NOVOS TRAITS DE TOLERÂNCIA A HERBICIDAS

Resumo

O número de casos de resistência ao herbicida glyphosate tem aumentado, principalmente em áreas de produção de grãos e fibra com culturas tolerantes a este herbicida. A planta daninha *Amaranthus palmeri* é uma das mais agressivas existentes nos Estados Unidos e resistentes ao glyphosate e, agora, presente no Brasil. Uma das estratégias para controle da espécie é a utilização de herbicidas em associação. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar potenciais misturas para o controle de *A. palmeri* em pós-emergência em culturas geneticamente modificadas com os novos traits de tolerância a herbicidas. O experimento foi conduzido aplicando-se as doses recomendadas para o controle dessa espécie (1X) dos herbicidas glyphosate, dicamba, 2,4-D, glufosinato de amônio, mesotrione e tembotrione, isolados e em associação, inclusive com fomesafen e bentazon, de acordo com a flexibilidade da tecnologia, em dois estádios fenológicos da planta daninha, sendo de 2 a 4 e 4 a 6 folhas. Foram avaliados o percentual de controle (%) e a biomassa (g) 21 dias após aplicação dos tratamentos (DAT). Os dados foram submetidos à Análise da Variância a 10% de significância e, uma vez encontrada interação entre os fatores, os níveis foram decompostos e comparados pelo teste de Tukey a 10% de significância. O glyphosate não apresentou controle satisfatório (< 28%) devido à resistência do biótipo. Os tratamentos com herbicidas em associação resultaram em elevada eficácia de controle (98 a 100%) e redução de biomassa (g) do *A. palmeri* em ambos os estádios fenológicos. Porém, as associações de mesotrione + bentazon e tembotrione + bentazon não obtiveram níveis satisfatórios de controle (< 37% para 2 a 4 folhas e 38-62% para 4 a 6 folhas). Embora os herbicidas dicamba, 2,4-D e glufosinato de amônio isolados tenham obtido controle satisfatório (88 a 100%), recomenda-se a aplicação em estágios iniciais de desenvolvimento da planta daninha. Esses resultados demonstram a importância do uso das culturas geneticamente modificadas com novos traits de tolerância a herbicidas no controle de *A. palmeri*, bem como alternativa para o manejo de resistência. Além disso, o uso dos herbicidas em associação em conjunto com as tecnologias visa reduzir a pressão de seleção, atribuindo o caráter de maior racionalidade no manejo de plantas daninhas através do uso dessas tecnologias, possivelmente resultando no atraso do surgimento de populações resistentes e sua sustentabilidade a longo prazo.

Palavras-chave: Eficácia; Glyphosate; Manejo; Associação de herbicidas

Abstract

Number of weed resistance cases to glyphosate has increased especially in areas cultivated with crops tolerant to this herbicide. The weed species *Amaranthus palmeri* is one of the most troublesome in United States and it is known to be resistant to glyphosate, and it was introduced to Brazil recently. A strategy to control this species is using herbicides mixtures. The objective of this research was to evaluate potential mixtures to control *A. palmeri* in post-emergence in genetically modified crops with new traits of herbicide tolerance. The study was performed using the recommended rate to control this species (1X) of the following herbicides: glyphosate, dicamba, 2,4-D, ammonium-glufosinate, mesotrione and tembotrione, isolated or associated, also including fomesafen and bentazon, according to what each

technology will allow, in two leaf-stages (2 to 4 and 4 to 6 leaves). Visual injury (%) and biomass (g) were evaluated 21 days after treatment (DAT). Data was subjected to Analysis of Variance under 10% of significance and once identified interaction between factors, their levels were compared by Tukey at 10% of significance. Glyphosate did not achieve satisfactory control (< 27%) because this biotype's resistance. Treatments with herbicides in association achieved higher levels of control (98-100%) and biomass (g) reduction of *A. palmeri* in both leaf-stages. However, associations between mesotrione + bentazon and tembotrione + bentazon were not satisfactory (< 37% for 2- to 4-leaves and 38-62% for 4- to 6-leaves). Dicamba, 2,4-D and glufosinate isolated achieved satisfactory control (88-100%), but it is recommended their application in early leaf-staged of this weed species. These results show the importance of using genetically modified crops with new traits of herbicide-tolerance to control *A. palmeri*, as well as an alternative to manage herbicide-resistant weeds. Besides, the use of herbicides in association in the new herbicide-tolerant crop technologies aims to reduce the selection pressure, providing a rational character to weed management through its use, aiming delay new cases of resistance and its sustainability in a long-term.

Keywords: Efficacy; Glyphosate; Management; Herbicide mixtures

6.1 Introdução

O glyphosate é o herbicida mais utilizado no mundo devido às suas características e a utilização das culturas geneticamente modificadas (DUKE e POWLES, 2008). É um herbicida sistêmico e não seletivo com ação de controle sobre todas espécies em diferentes fases do ciclo. As culturas tolerantes ao glyphosate foram ampla e rapidamente adotadas devido à praticidade e benefícios que essa plataforma de manejo oferece, tais como a ausência de fitotoxicidade às culturas e amplo espectro de controle (DUKE e POWLES, 2008; POWLES, 2008). Pode-se considerar que essa tecnologia revolucionou o manejo de plantas daninhas uma vez que simplificou completamente o sistema de controle à aplicação do glyphosate.

O uso repetitivo desse único modo de ação herbicidas em safras consecutivas ao longo dos anos causou pressão de seleção ao sistema, resultando no surgimento de populações de plantas daninhas resistentes. O número de casos de resistência ao glyphosate tem aumentado nos últimos anos, e até o momento 39 espécies resistentes foram identificadas, sendo 18 monocotiledôneas e 21 dicotiledôneas, incluindo o *Amaranthus palmeri* (HEAP, 2017). O primeiro caso de *A. palmeri* resistente ao glyphosate foi identificado no estado da Geórgia, nos Estados Unidos (CULPEPPER et al., 2006) e rapidamente se propagou principalmente pela região sul do país (BECKIE, 2006; WEBSTER e NICHOLS, 2012; RIAR et al., 2013). A dioécia, a elevada produção de sementes e o transporte de grãos-de-pólen a grandes distâncias favorecem a dinâmica da resistência (FRANSSEN et al., 2001;

SOSNOSKIE et al., 2012; WARD et al., 2013). No entanto, a utilização unicamente do glyphosate como ferramenta de controle e a ausência de outras práticas de manejo foram os principais fatores de impacto que resultaram na evolução de biótipos resistentes (NORSWORTHY et al., 2012; KNISS, 2017).

O *A. palmeri* é uma planta de porte ereto, rápido crescimento, elevada produção de sementes e com amplo fluxo de emergência, que foi classificada como uma das mais problemáticas em áreas de produção de soja e algodão nos Estados Unidos (RIAR et al., 2013; SELLERS et al., 2003; HORAK e KLOUGHIN, 2000). Um dos fatores que tem atribuído essa classificação à espécie é a capacidade de evoluir e surgirem biótipos resistentes a herbicidas (BELL et al., 2013; WARD et al., 2013; CULPEPPER et al., 2006). Além do glyphosate, há populações de *A. palmeri* resistentes também a diversos outros modos de ação herbicida, tais como ALS, PPO, FSII, HPPD e inibidores da divisão da tubulina e, frequentemente, populações com resistência múltipla a herbicidas são observadas, o que torna o seu controle químico mais problemático (HEAP, 2017).

A utilização de herbicidas é o método de controle mais utilizado devido a praticidade e elevados níveis de eficácia associados a custo baixo se comparado com outros métodos de controle (OLIVEIRA JR. et al, 2011). O uso do glyphosate é bastante amplo em áreas de culturas perenes e em sistemas conservacionistas, como o plantio direto, e se intensificou em culturas anuais com o a adoção das culturas tolerantes (GIVENS et al., 2009). No entanto, devido ao seu uso repetitivo ao longo dos anos, populações resistentes têm sido selecionadas e aumentado significativamente e, conseqüentemente, resultando na insustentabilidade de uso da molécula (NORSWORTHY et al., 2012). Devido ao aumento nos casos de resistência, seu uso como única ferramenta no controle de plantas daninhas tem se tornado inviável em alguns locais (NORSWORTHY et al., 2012).

Os herbicidas inibidores da protoporfirinogênio-oxidase (PPO) são alguns dos mais utilizados como alternativa no controle de espécies resistentes ao glyphosate. Porém, biótipos de *A. palmeri* resistentes a inibidores da protox foram identificados no Arkansas, Estados Unidos (SALAS et al., 2016). Anterior as culturas tolerantes ao glyphosate, os inibidores da ALS foram amplamente utilizados, mas um dos fatores que atribuiu menor importância ao grupo foram os inúmeros casos de resistência (TRANIEL e WRIGHT, 2002). A resistência a ALS está amplamente difundida em populações de *A. palmeri* (BOND, et al., 2006; HEAP, 2017). Esse ciclo vicioso de uso exaustivo de um mesmo modo de ação herbicida inviabilizou não só a utilização de inibidores da ALS e glyphosate como vem acontecendo com outros grupos químicos no controle de algumas espécies, como é o caso de inibidores da protox.

Como consequência, em algumas localidades dos Estados Unidos o *A. palmeri* está apenas a três mecanismos de ação de não se ter mais opções de controle em pós-emergência – inibidores do fotossistema II, inibidores da glutamina sintetase e mimetizadores da auxina (SCOTT et al., 2014).

A dependência de herbicidas no controle de plantas daninhas pode tornar o controle químico insustentável a médio e longo prazos (NORSWORTHY et al., 2012). Porém, quando pensando unicamente no controle químico, algumas estratégias que visam reduzir a pressão de seleção podem ser adotadas com a finalidade de retardar o surgimento de biótipos resistentes. Assim, pode se citar a rotação de mecanismos de ação herbicida em safras e anos agrícolas subsequentes, a utilização de herbicidas pré-emergentes, além de aplicações sequenciais e a utilização de misturas de herbicidas em tanque (DIGGLE et al., 2003, BECKIE, 2006; NEVE, 2008, BECKIE e REBOUD, 2009; NEVE et al., 2010).

Para obtenção de maior eficácia e sustentabilidade é necessário diversificar as práticas manejo (NORSWORTHY et al., 2012). No entanto, com o uso das culturas tolerantes ao glyphosate, a diversidade de mecanismos de ação herbicidas e até mesmo o uso de pré-emergentes tem sido deixado de lado, tampouco os métodos de controle culturais têm sido integrados ao sistema (JOHNSON et al, 2007; RIAR et al., 2013). Com as dificuldades de controle da flora infestante devido à presença de espécies tolerantes e resistentes, o manejo de controle de plantas daninhas baseado unicamente na utilização do glifosato vem se tornando insustentável à agricultura (WEBSTER e SOSNOSKIE, 2009; NORSWORTHY et al., 2012).

Como resposta ao aumento dos casos de plantas daninhas resistentes e ausência de descoberta de novas moléculas herbicidas, culturas com tolerância a outros herbicidas vem sendo desenvolvidas, tais como dicamba, 2,4-D, glufosinato de amônio, mesotrione e tembotrione. Em áreas de produção de soja e algodão convencionais ou tolerantes ao glyphosate, as aplicações de herbicidas em pós emergência ficam restritas a três mecanismos de ação, sendo os inibidores da EPSPS, ALS e PPO. Uma vez que a resistência ao glyphosate e ALS está amplamente difundida em populações de *A. palmeri* (HEAP, 2017), restaria somente os herbicidas inibidores da protox como opção efetiva. Em cenário de culturas tolerantes a herbicidas com novos traits de resistência, outros mecanismos de ação podem ser adicionados como opção em pós emergência, como dicamba, 2,4-D, glufosinato de amônio, mesotrione e tembotrione (RIAR et al., 2013; SCOTT et al., 2014).

As novas tecnologias que permitirão uso desses herbicidas nas culturas poderão ser incluídas ao sistema, propondo novas abordagens de manejo, diversificando os programas de manejo atuais. (MILLER e NORSWORTHY, 2016). Essas novas tecnologias, além de serem

ferramentas alternativas também para o controle plantas daninhas resistentes e de difícil controle pelo glyphosate. Como populações de plantas daninhas resistentes a novos mecanismos de ação podem surgir, estratégias de manejo podem ser compostas pelo uso de múltiplos herbicidas ou culturas com diversos traits de tolerância (GREEN et al., 2008). A aplicação de herbicidas como dicamba, 2,4-D, glufosinato de amônio, glyphosate, e suas combinações permitem a aplicação de múltiplos mecanismos de ação, que é um componente importante para o manejo da resistência (NORSWORTHY et al., 2012).

Sendo assim, os objetivos dessa seção foram avaliar a eficácia dos herbicidas relacionados aos novos traits de resistência em culturas agronômicas sobre o controle do biótipo brasileiro de *A. palmeri* em dois estádios fenológicos e identificar potenciais misturas para o controle do biótipo bem como os níveis de controle em cenário dos novos traits de resistência.

6.2 Material e métodos

O experimento foi conduzido entre outubro de 2016 e janeiro de 2017 em casa de vegetação localizada nas dependências do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), em Piracicaba, SP. O biótipo de *A. palmeri* (BR-R) utilizado nesse estudo foi originalmente coletado no estado do Mato Grosso.

As sementes foram dispostas em excesso em pote plástico preenchido com substrato comercial de casca de pinus e quando apresentavam as folhas cotiledonares inteiramente expandidas foram transplantados para as unidades experimentais. Cada unidade experimental foi composta de um vaso plástico com volume de 250 mL preenchidos com o mesmo substrato citado anteriormente, contendo duas plantas por vaso.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições. Os tratamentos foram organizados em esquema fatorial 19 x 2, em que 19 foram os tratamentos herbicidas utilizados (Tabela 6.1) e dois foram os estádios de desenvolvimento da planta daninha no momento da pulverização (de 2 a 4 e 4 a 6 folhas verdadeiras expandidas).

A aplicação dos tratamentos foi feita utilizando pulverizador costal, pressurizado com CO₂, regulado para volume de calda proporcional a 200 L ha⁻¹, equipada com barra de

duas pontas, e bicos de abertura do tipo jato plano (TeeJet 110.01) posicionada a 0,5 m do alvo.

As avaliações de controle foram feitas aos 21 dias após a aplicação dos tratamentos (DAA) com base em escala visual, comparando-se os tratamentos à testemunha, atribuindo-se a nota 0 para ausência de sintomas do herbicida e 100% para morte das plantas. Aos 21 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT), foi feita a coleta de biomassa das parcelas. A coleta do material vegetal foi seguida do armazenamento em sacos de papel identificados e postos em estufa de circulação forçada à 60 °C durante 72 horas para secagem.

Os dados foram analisados com o auxílio do programa SISVAR, submetidos ao teste F na Análise de Variância, com nível de significância de 10%. Uma vez significativa, a interação foi decomposta e os fatores de tratamentos (herbicidas e estádios fenológicos) foram comparados segundo o teste de comparação de médias de Tukey a 10% de significância.

Tabela 6.1 – Tratamentos utilizados para o controle do biótipo brasileiro de *Amaranthus palmeri* em dois estádios fenológicos. Piracicaba, SP, 2017.

Tratamento	Ingrediente ativo	Produto Comercial	Dose
			g i.a. ha ⁻¹
1	-	Testemunha	
2	Glyphosate	Roundup Original	1440
3	Dicamba	Dicamba	720
4	2,4-D	DMA	1005
5	Glufosinato de amônio*	Liberty	400
6	Mesotrione*	Callisto	120
7	Tembotrione*	Soberan	100,8
8	Glyphosate + Dicamba	Roundup Original + Dicamba	720 + 720
9	Glyphosate + 2,4-D	Roundup Original + DMA	720 + 1005
10	Glyphosate + Fomesafen*	Roundup Original + Flex	720 + 250
11	Dicamba + Fomesafen*	Dicamba + Flex	720 + 250
12	2,4-D + Fomesafen*	DMA + Flex	1005 + 250
13	Glufosinato de amônio + Dicamba*	Liberty + DMA	400 + 720
14	Glufosinato de amônio + 2,4-D*	Liberty + Dicamba	400 + 1005
15	Glufosinato de amônio + Fomesafen*	Liberty + Flex	400 + 250
16	Glufosinato de amônio + Mesotrione*	Liberty + Callisto	400 + 120
17	Glufosinato de amônio + Tembotrione*	Liberty + Soberan	400 + 100,8
18	Mesotrione + Bentazon*	Callisto + Basagran	120 + 720
19	Tembotrione + Bentazon*	Soberan + Basagran	100,8 + 720
*: adição de adjuvante (óleo metilado de soja ou óleo mineral) à			0,5% v/v.

6.3 Resultados e discussão

A maioria dos tratamentos resultou no controle do biótipo brasileiro de *A. palmeri* para ambos os estádios fenológicos estudados (Tabela 6.2). O herbicida glyphosate (1440 g i.a. ha⁻¹), mesmo aplicando-se o dobro da dose tipicamente recomendada para espécies de *Amaranthus*, teve baixa eficácia (23,75 a 27,50%) devido à resistência do *A. palmeri*. Embora Starke e Oliver (1998) tenham observado antagonismo de glyphosate e fomesafen no controle de *A. palmeri*, na presente pesquisa a utilização dos dois herbicidas em associação resultou em controle total da espécie (100%) em ambos os estádios fenológicos (2 a 4 e 4 a 6 folhas). Uma vez que o biótipo brasileiro de *A. palmeri* é resistente ao glyphosate (CARVALHO et al., 2015), sugere-se que o elevado nível de controle decorrente do tratamento glyphosate + fomesafen (1440 + 250 g i.a. ha⁻¹) seja decorrente da ação do herbicida fomesafen.

Para a variável controle, os tratamentos mesotrione (120), mesotrione + bentazon (120 + 720) e tembotrione + bentazon (100,8 + 720 g i.a. ha⁻¹) foram insatisfatórios no controle das plantas de 2 a 4 folhas (27,50 a 62,50%). Esses tratamentos e o tembotrione isolado (100,8 g i.a. ha⁻¹) foram também insatisfatórios no estágio fenológico de 4 a 6 folhas (31,25 a 78,75%). Os tratamentos baseados no uso dos inibidores da enzima 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenase (HPPD), isolados ou em associação com o bentazon, também resultaram em menor redução da biomassa em ambos os estádios, indicando menor eficácia de controle. Ressalta-se que para aumentar eficácia de controle de inibidores da HPPD, é recomendada associação com inibidores do fotossistema II, devido ao sinergismo que ocorre entre os dois mecanismos de ação herbicida (ARMEL et al., 2005; HUGIE et al., 2008; WOODYARD et al., 2009; WILLIAMS et al., 2011). No entanto, o sinergismo ocorre utilizando-se herbicidas principalmente do grupo químico das triazinas, e não foi observado em associação com o bentazon.

Os herbicidas dicamba (720), 2,4-D (1005) e glufosinato de amônio (400 g i.a. ha⁻¹) foram os que melhor controlaram o *A. palmeri* quando isolados (88,50 a 100%). O dicamba resultou em menor redução da biomassa no estágio de 4 a 6 folhas, comparado aos melhores resultados, mas foi superior à testemunha sem aplicação e ao glyphosate isolado, e não diferindo do 2,4-D. Crespo et al. (2016) testaram a suscetibilidade de diferentes biótipos a 2,4-D e dicamba e observaram que apenas 8% das plantas tratadas com 2,4-D e 31% com dicamba resultaram em controle de 100%. O amônio-glufosinato é um dos principais herbicidas utilizados como alternativa no controle de *A. palmeri* resistente ao glyphosate em pós-emergência. Embora não tenham sido observadas diferenças entre os resultados de

controle e redução de biomassa nos diferentes estádios fenológicos da planta, ressalta-se a importância da aplicação em fases iniciais de desenvolvimento da espécie para garantir o sucesso da aplicação (THARP et al., 1999; NORSWORTHY et al., 2012). Os mimetizadores de auxinas são mais eficientes no controle de *A. palmeri* quando se utiliza duas doses, seja em aplicação única ou sequencial (MERCHANT et al., 2014).

Os tratamentos glyphosate + dicamba (1440 +720) e glyphosate + 2,4-D (1440 + 1005) atingiram níveis de controle superiores a 98% (2 a 4 folhas) e 100% (4 a 6 folhas). As associações entre herbicidas auxínicos e glyphosate apresentam sinergismo no controle de plantas daninhas dicotiledôneas, incluindo biótipos resistentes ao glyphosate (MERCHANT et al., 2014). Chahal e Jhonson (2012) observaram que a adição de 2,4-D ao glyphosate resultou em 99% de controle de buva resistente ao glyphosate, comparado com 12% de controle com o glyphosate isolado. Além disso, o dicamba apresenta maior eficácia de controle quando é associado a outros herbicidas (YORK et al., 2012; SANDERS e MARSHALL, 2014; CAHOON et al., 2015; YORK et al., 2015).

A utilização do dicamba, 2,4-D e amônio glufosinato em associação com outros herbicidas resultou no melhor controle em ambos os estádios fenológicos, entre 98,25 e 100% para plantas mais jovens e 100% para as plantas entre 4 e 6 folhas. A utilização de misturas de 2,4-D e glufosinato ou dicamba e glufosinato aumentaram o nível de controle de *A. rudis* e *A. palmeri*, comparado a tratamentos compostos somente pelo glufosinato (CRAIGMYLE et al., 2013; MERCHANT et al., 2013). Botha et al. (2014) observaram controle de *A. palmeri* com glufosinato de amônio em 91%, 2,4-D em 93% e dicamba em 83%, quando isolados, e de 100% quando foram aplicados 2,4-D + glufosinato de amônio ou dicamba + glufosinato de amônio em condições de campo.

Tabela 6.2 – Controle (%) e biomassa (g) de *Amaranthus palmeri* aos 21 DAT baseado no uso das tecnologias de culturas geneticamente modificadas com novos *traits* de tolerância a herbicidas em dois estádios fenológicos. Piracicaba, SP, 2018.

Tratamento	Ingrediente ativo (i.a.)	Dose (g i.a. ha ⁻¹)	Controle (%)		Biomassa (g)	
			2 a 4 folhas	4 a 6 folhas	2 a 4 folhas	4 a 6 folhas
1	-	-	0,00 cA	0,00 fA	1,19 cA	1,63 gA
2	Glyphosate	1440	27,50 bA	23,75 eA	0,76 bcA	0,95 fA
3	Dicamba	720	99,75 aA	88,50 abB	0,06 aA	0,35 cdeB
4	2,4-D	1005	100,00 aA	97,50 aA	0,00 aA	0,06 abcA
5	Glufosinato de amônio ¹	400	100,00 aA	100,00 aA	0,00 aA	0,00 aA
6	Mesotrione ²	120	27,50 bA	31,25 deA	1,19 cB	0,62 efA
7	Tembotrione ¹	100,8	98,25 aA	78,75 bB	0,00 aA	0,24 bcdB
8	Glyphosate + Dicamba	720 + 720	98,75 aA	100,00 aA	0,02 aA	0,03 abA
9	Glyphosate + 2,4-D	720 + 1005	98,25 aA	100,00 aA	0,06 aA	0,00 aA
10	Glyphosate + Fomesafen ²	720 + 250	98,25 aA	100,00 aA	0,05 aA	0,00 aA
11	Dicamba + Fomesafen ²	720 + 250	100,00 aA	100,00 aA	0,00 aA	0,00 aA
12	2,4-D + Fomesafen ²	1005 + 250	99,25 aA	100,00 aA	0,00 aA	0,00 aA
13	Glufosinato de amônio ¹ + Dicamba	400 + 720	100,00 aA	100,00 aA	0,00 aA	0,00 aA
14	Glufosinato de amônio ¹ + 2,4-D	400 + 1005	100,00 aA	100,00 aA	0,00 aA	0,00 aA
15	Glufosinato de amônio ¹ + Fomesafen ²	400 + 250	100,00 aA	100,00 aA	0,00 aA	0,00 aA
16	Glufosinato de amônio ¹ + Mesotrione ²	400 + 120	100,00 aA	100,00 aA	0,00 aA	0,00 aA
17	Glufosinato de amônio ¹ + Tembotrione ¹	400 + 100,8	100,00 aA	100,00 aA	0,00 aA	0,00 aA
18	Mesotrione ² + Bentazon ²	120 + 720	36,25 bA	38,75 dA	0,40 bA	0,46 defA
19	Tembotrione ¹ + Bentazon ²	100,8 + 720	36,25 bA	62,50 cB	0,37 bB	0,24 bcdA
CV (%)			6,7		32,19	

¹: óleo metilado de soja à 0,5% v/v; ²: óleo mineral à 0,5% v/v; %: percentagem; g: gramas; DAT: dias após aplicação dos tratamentos; Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si, segundo o Teste de Tukey a 10% de significância; Médias de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si segundo o Teste de Tukey a 5% de significância; Dados originais de controle e biomassa apresentados, mas os dados de biomassa foram previamente transformados por $\sqrt{X + 1}$ para realização dos testes estatísticos.

Meyer et al. (2015) não encontraram diferenças entre as tecnologias de tolerância ao 2,4-D e dicamba, mas observaram que as futuras tecnologias de culturas geneticamente modificadas com novos *traits* de tolerância a herbicidas são vantajosas no controle de *A. palmeri* resistente ao glyphosate. Beckie (2006) e Green e Owen (2011) descrevem como benefícios da utilização de herbicidas em associação o maior espectro de controle, além de elevada eficácia quando comparado a aplicações de herbicidas isolados. Além disso, as associações de herbicidas podem ser utilizadas como estratégia para retardar o surgimento da resistência (DIGGLE et al., 2003, BECKIE, 2006; NEVE, 2008, BECKIE e REBOUD, 2009; NEVE et al., 2010; LAGATOR et al., 2013). A diversidade de mecanismos de ação é promissora para o controle de *A. palmeri* e, uma vez que as novas tecnologias estiverem disponíveis no mercado, aplicações em associações de diferentes mecanismos de ação na mesma pulverização são preferíveis para reduzir a possibilidade de surgimento de novos casos de resistência (MEYER et al., 2015).

Com as novas tecnologias de culturas geneticamente modificadas com novos *traits* de tolerância a herbicidas, as melhores estratégias para o seu uso racional e sustentabilidade a longo prazo dependem do uso de múltiplos mecanismos de ação efetivos no controle do *A. palmeri* incorporado a sistemas de manejo integrado (MEYER et al., 2015; MILLER e NORSWORTHY, 2016). Além disso, essas tecnologias podem ser utilizadas no manejo de outras plantas daninhas resistentes ou de espécies de difícil controle pelo glyphosate. Para o sucesso do manejo, recomenda-se integrar métodos não-químicos às práticas de controle juntamente com o uso dos herbicidas que poderão ser utilizados nas novas culturas tolerantes a herbicidas em futuro breve. com aqui estudados along with using the herbi- cides that can be applied in future herbicide- resistant soybean traits will serve as the premise of best management practices.

6.4 Conclusões

Os tratamentos de herbicidas isolados que melhor controlaram o biótipo brasileiro de *A. palmeri* foram: dicamba (720), 2,4-D (1005) e glufosinato de amônio (400). Os tratamentos glyphosate (1440), mesotrione (120) e tembotrione (100,8 g i.a. ha⁻¹) foram insatisfatórios.

A utilização dos herbicidas dicamba, 2,4-D e glufosinato de amônio em associação com outros herbicidas, inclusive o glyphosate, resultaram em índices de controle mais elevados.

Para o controle de *A. palmeri*, recomenda-se que a aplicação de herbicidas seja feita em estádios iniciais de desenvolvimento da planta.

Os novos eventos transgênicos podem ser utilizados como alternativa para o manejo do *A. palmeri* no Brasil, além de outras espécies resistentes ou de difícil controle pelo glyphosate, uma vez que possibilita a diversificação de mecanismos de ação em pós-emergência das culturas.

A utilização de herbicidas em associação pode resultar em maior eficácia de controle e dão suporte para uso racional dos novos eventos transgênicos.

Referências bibliográficas

ARMEL, G.R.; HALL, G.J.; WILSON, H.P.; CULLEN, N. Mesotrione plus atrazine mixtures for control of Canada thistle (*Cirsium arvense*). **Weed Science**, v. 53, p. 202-211, 2005.

BECKIE, H.J. Herbicide resistant weeds: management tactics and practices. **Weed Technology**, v. 20, p. 793-814, 2006.

BECKIE, H.J.; REBOUD, X. Selecting for weed resistance: herbicide rotation and mixture. **Weed Technology**, v. 23, p. 363-370, 2009.

BELL, M.S.; HAGER, A.G.; TRANEL, P.J. Multiple resistance to herbicides from four site-of-action groups in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). **Weed Science**, v. 61, p. 460-468, 2013.

BOND, J.A.; OLIVER, L.R.; STEPHENSON IV, D.O. Response of Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) accessions to glyphosate, fomesafen, and pyriithiobac. **Weed Technology**, v. 20, p. 885-892, 2006.

BOTHA, G.M.; BURGOS, N.R.; GBUR, E.E.; ALCOBER, E.A.; SALAS, R.A.; SCOTT, R.S. Interaction of glufosinate with 2,4-D, dicamba, and tembotrione on glyphosate-resistant *Amaranthus palmeri*. **American Journal of Experimental Agriculture**, v. 4, p. 427-442, 2014.

CAHOON, C.W.; YORK, A.C.; JORDAN, D.L.; EVERMAN, W.J.; SEAGROVES, R.W.; CULPEPPER, A.S.; EURE, P.M. Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) management in dicamba-resistant cotton. **Weed Technology**, v. 29, p. 758-770, 2015.

CARVALHO, S.J.P.; GONÇALVES NETTO, A.; NICOLAI, M.; CAVENAGHI, A.L.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Detection of glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) in agricultural areas of Mato Grosso, Brazil. **Planta Daninha**, v. 33, p. 579-586, 2015.

CHAHAL, G.S.; JOHNSON, W.G. Influence of glyphosate or glufosinate combinations with growth regulator herbicides and other agrochemicals in controlling glyphosate-resistant weeds. **Weed Technology**, v. 26, p. 638-643, 2012.

CRAIGMYLE, B.D.; ELLIS, J.M.; BRADLEY, K.W. Influence of herbicide programs on weed management in soybean with resistance to glufosinate and 2,4-D. **Weed Technology**, v. 27, p. 78-84, 2013.

CRESPO, R.J.; WINGEYER, A.B.; BORMAN, C.J.; BERNARDS, M.L. Baseline sensitivity of Nebraska waterhemp and Palmer amaranth to dicamba and 2,4-D. **Agronomy Journal**, v. 108, p. 1649-1655, 2016.

CULPEPPER, A.S.; GREY, T.L.; VENCILL, W.K.; KICHLER, J.M.; WEBSTER, T.M.; BROWN, S.M.; YORK, A.C.; DAVIS, J.W.; HANNA, W.W. (2006) Glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) confirmed in Georgia. **Weed Science**, v. 54, p. 620-626, 2006.

DIGGLE, A.J.; NEVE, P.B.; SMITH, F.P. Herbicides used in combination can reduce the probability of herbicide resistance in finite weed populations. **Weed Research**, v. 43, p. 371-382, 2003.

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

FRANSSEN, A.S.; SKINNER, D.Z.; AL-KHATIB, K.; HORAK, M.J.; KULAKOW, P.A. Interspecific hybridization and gene flow of ALS resistance in *Amaranthus* species. **Weed Science**, v. 49, p. 598-606, 2001.

GIVENS, W.A.; SHAW, D.R.; JOHNSON, W.G.; WELLER, S.C.; YOUNG, B.G.; WILSON, R.G.; OWEN, M.D.K.; JORDAN, D. A grower survey of herbicide use patterns in glyphosate-resistant cropping systems. **Weed Technology**, v. 23, p. 156-161, 2009.

GREEN, J.M.; HAZEL, C.B.; FORNEY, D.R.; PUGH, L.M. New multiple herbicide crop resistance and formulation technology to augment the utility of glyphosate. **Pest Management Science**, v. 64, p. 332-339, 2008.

GREEN, J.M.; OWEN, M.D.K. Herbicide resistant crops: utilities and limitations for herbicide-resistant weed management. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5819-5829, 2011.

HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. Disponível em: www.weedscience.org. Acesso em: 01/12/2017.

HORAK, M.J.; LOUGHIN, T.M. Growth analysis of four *Amaranthus* species. **Weed Science**, v. 48, p. 347-355, 2000.

HUGIE, J.A.; BOLLERO, G.A.; TRANEL, P.J.; RIECHERS, D.E. Defining the rate requirements for synergism between mesotrione and atrazine in Redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*). **Weed Science**, v. 56, p. 265-270, 2008.

JOHNSON, W.G.; GIBSON, K.D.; CONLEY, S.P. Does weed size matter? An Indiana grower perspective about weed control timing. **Weed Technology**, v. 21, p. 542-546, 2007.

KNISS, A.R. Genetically engineered herbicide-resistant crops and herbicide-resistant weed evolution in the United States. **Weed Science**, v. 66, p. 1-14, 2017.

LAGATOR, M.; VOGWILL, T.; MEAD, A.; COLEGRAVE, N.; NEVE, P. Herbicide mixtures at high doses slow the evolution of resistance in experimentally evolving populations of *Chlamydomonas reinhardtii*. **New Phytologist**, v. 198, p. 938-945, 2013.

MERCHANT, R.M.; CULPEPPER, A.S.; EURE, P.M.; RICHBURG, J.S.; BRAXTON, L.B. Controlling glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) in cotton with resistance to glyphosate, 2,4-D and glufosinate. **Weed Technology**, v. 28, p. 291-297, 2014.

MERCHANT, R.M.; SOSNOSKIE, L.M.; CULPEPPER, A.S.; STECKEL, L.E.; YORK, A.C.; BRAXTON, L.B.; FORD, J.C. Weed response to 2,4-D, 2,4-DB, and dicamba applied alone or with glufosinate. **The Journal of Cotton Science**, v. 17, p. 212-218, 2013.

MEYER, C.J.; NORSWORTHY, J.K.; YOUNG, B.G.; STECKEL, L.E.; BRADLEY, K.W.; JOHNSON, W.G.; LOUX, M.M.; DAVIS, V.M.; KRUGER, G.R.; BARARPOUR, M.T.; IKLEY, J.T.; SPAUNHORST, D.J.; BUTTS, T.R. Herbicide program approaches for managing glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) and waterhemp (*Amaranthus tuberculatus* and *Amaranthus rudis*) in future soybean-trait technologies. **Weed Technology**, v. 29, p. 716-729, 2015.

MILLER, M.R.; NORSWORTHY, J.K. Evaluation of herbicide programs for use in a 2,4-D-resistant soybean technology for control of glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). **Weed Technology**, v. 30, p. 366-376, 2016.

NEVE, P.; NORSWORTHY, J.K.; SMITH, K.L.; ZELAYA, I.A. Modellinf evolution and management of glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Weed Research**, v. 51, p. 99-112, 2010.

NEVE, P. Simulation modelling to understand the evolution and management of glyphosate resistance in weeds. **Pest Management Science**, v. 64, p. 392-401, 2008.

NORSWORTHY, J.K.; WARD, S.M.; SHAW, D.R.; LLEWELLYN, R.S.; NICHOLS, R.L.; WEBSTER, T.M.; BRADLEY, K.W.; FRISVOLD, G.; POWLES, S.B.; BURGOS, N.R.; WITT, W.W.; BARRETT, M. Reducing the risks of herbicide resistance: best management practices and recommendations. **Weed Science**, v. 60, p. 31-62, 2012.

OLIVEIRA JR., R.S., CONSTANTIN, J., INOUE, M.H. Biologia e manejo de plantas daninhas. Curitiba, PR: Ed. Omnipax, 2011, 348p.

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

RIAR, D.S.; NORSWORTHY, J.K.; STECKEL, L.E.; STEPHENSON, D.O.; EUBANK, T.W.; BOND, J.; SCOTT, R.C. Adoption of best management practices for herbicide-resistant weeds in mid- southern United States cotton, rice, and soybean. **Weed Technology**, v. 27, p. 788-797, 2013

SALAS, R.A.; BURGOS, N.R.; TRANEL, P.J.; SINGH, S.; GLASGOW, L.; SCOTT, R.C.; NICHOLS, R.L. Resistance to PPO-inhibiting herbicide in Palmer amaranth from Arkansas. **Pest Management Science**, v. 72, p. 864-869, 2016.

SANDERS, C.H.; MARSHALL, M.W. Weed management systems in dicamba and 2,4-D tolerant cotton. In: **Proceedings of the 2014 Southern Weed Science Society annual meeting**. Birmingham, AL: Southern Weed Science Society, p. 63, 2014.

SELLERS, B.A.; SMEDA, R.J.; JOHNSON, W.G.; KENDIG, J.A.; ELLERSIECK, M.R. Comparative growth of six *Amaranthus* species in Missouri. **Weed Science**, v. 51, p. 329-333, 2003.

SCOTT, R.C.; BARBER, L.T.; BOYD, J.W.; NORSWORTHY, J.K.; BURGOS, N.R. **Recommended chemicals for weed and brush control**. Little Rock, AR: The University of Arkansas Division of Agriculture Cooperative Extension Service, Miscellaneous Publication 44. p 38-57, 2014.

SOSNOSKIE, L.M.; WEBSTER, T.M.; KICHLER, J.M.; MACRAE, A.W.; GREY, T.L.; CULPEPPER, A.S. Pollen-mediated dispersal of glyphosate-resistance in Palmer amaranth under field conditions. **Weed Science**, v. 60, p. 366-373, 2012.

STARKE, R.J.; OLIVER, L.O. Interaction of glyphosate with chlorimuron, fomesafen, imazethapyr, and sulfentrazone. **Weed Science**, v. 46, p. 652-660, 1998.

THARP, B.E.; SHABENBERGER, O.; KELLS, J.J. Response of annual weed species to glufosinate and glyphosate. **Weed Technology**, v.13, p. 541-545, 1999.

TRANDEL, P.J.; WRIGHT, T.R. Resistance of weeds to ALS inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, v. 50, p. 700-712, 2002.

WARD, S.; WEBSTER, T.M.; STECKEL, L.E. Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*): A review. **Weed Technology**, v. 27, p. 12-27, 2013.

WEBSTER, T. M.; NICHOLS, R. L. Changes in the prevalence of weed species in the major agronomic crops of the Southern United States: 1994/1995 to 2008/2009. **Weed Science**, v. 60, p. 145-157, 2012.

WEBSTER, T.M.; SOSNOSKIE, L.M. Loss of glyphosate efficacy: a changing weed spectrum in Georgia cotton. **Weed Science**, v. 58, p. 73-79, 2009.

WILLIAMS, M.M.; BOYDSTON, R.A.; PEACHEY, E.E.; ROBINSON, D. Significance of atrazine as a tank-mix partner with tembotrione. **Weed Technology**, v. 25, p. 299-302, 2011.

WOODYARD, A.J.; HUGIE, J.A.; RIECHERS, D.E. Interactions of mesotrione and atrazine in two weed species with different mechanisms for atrazine resistance. **Weed Science**, v. 54, p. 369-378, 2009.

YORK, A.C.; CAHOON, C.W.; OLIVER, G.W. Palmer amaranth management with Engenia in BollGard II XtendFlex cotton. In: **Proceedings of the Southern Weed Science Society**. Savannah, GA: Southern Weed Science Society, p. 174, 2015.

YORK, A.C.; CULPEPPER, A.S.; SOSNOSKIE, L.M.; BOLLMAN, S. Palmer amaranth management in dicamba/glufosinate tolerant cotton. In: **Proceedings of the Southern Weed Science Society**. Charleston, SC: Southern Weed Science Society, p. 98, 2012.

7. CONCLUSÕES GERAIS

A espécie de *Amaranthus* recém introduzida no Brasil foi identificada como *A. palmeri*, através do bioensaio de genotipagem do SNP678 pelo método da KASP, em comparação com biótipos conhecidos de *A. palmeri* e *A. tuberculatus*.

O biótipo brasileiro de *A. palmeri* (BR-R) possui resistência aos herbicidas, inibidores da ALS, observado através da alta taxa de sobrevivência (>88%). A resistência a esse grupo de herbicidas ocorre em BR-R devido à presença das mutações W574L e S653N na sequência de aminoácidos que constituem a enzima.

BR-R é também resistente ao glyphosate, com DL_{50} de 4.426 g e.a. ha^{-1} e fator de resistência de 16. BR-R O mecanismo de resistência presente no biótipo é o aumento no número de cópias da EPSPS decorrente da amplificação gênica, sendo que BR-R apresentou entre 50 e 179 cópias da EPSPS relativas à ALS.

Os tratamentos de herbicidas que melhor controlaram o biótipo brasileiro de *A. palmeri* foram (g ha^{-1}): dicamba (720), 2,4-D (1005) e glufosinato de amônio (400) isolados. Em associação, destacaram-se os tratamentos glyphosate + dicamba (1440 + 720), glyphosate + 2,4-D (1440 + 1005), glyphosate + fomesafen (1440 + 250), dicamba + fomesafen (720 + 250), 2,4-D + fomesafen (1005 + 250), glufosinato de amônio + fomesafen (400 + 250), glufosinato de amônio + dicamba (400 + 720), glufosinato de amônio + 2,4-D (400 + 1005), glufosinato de amônio + mesotrione (400 + 120), glufosinato de amônio + tembotrione (400 + 100,8).

A aplicação de herbicidas para o controle de *A. palmeri* é recomendada em estádios iniciais de desenvolvimento da planta. Os novos eventos transgênicos podem ser utilizados como alternativa para o manejo do *A. palmeri* no Brasil, uma vez que possibilita a diversificação de mecanismos de ação em pós-emergência das culturas. A utilização de herbicidas em associação pode resultar em maior eficácia de controle e dão suporte para uso racional dos novos eventos transgênicos.