

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IMPACTO DA RESISTÊNCIA AO GLYPHOSATE EM  
GENÓTIPOS DE AZEVÉM E DE CAPIM-PÉ-DE-GALINHA**

**Arthur Arrobas Martins Barroso  
Engenheiro Agrônomo**

**2017**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IMPACTO DA RESISTÊNCIA AO GLYPHOSATE EM  
GENÓTIPOS DE AZEVÉM E DE CAPIM-PÉ-DE-GALINHA**

**Arthur Arrobas Martins Barroso**

**Orientador: Prof. Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves**

**Coorientador: Prof. Dr. Martin Vila-Aiub**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal)**

**2017**

B277i Barroso, Arthur Arrobas Martins  
Impacto da resistência ao glyphosate em genótipos de azevém e de capim-pé-de-galinha / Arthur Arrobas Martins Barroso. - - Jaboticabal, 2017  
viii, 68 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017  
Orientador: Pedro Luis da Costa Aguiar Alves  
Coorientador: Martin Vila-Aiub  
Banca examinadora: Ricardo Victória Filho, Caio Antonio Carbonari, Rubem Silvério de Oliveira Junior, Leonardo Bianco de Carvalho  
Bibliografia

1. Resistência. 2. Herbicidas. 3. Proteômica. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.954:633.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: IMPACTO DA RESISTÊNCIA AO GLYPHOSATE EM GENÓTIPOS DE AZEVÉM E DE CAPIM-PÉ-DE-GALINHA

**AUTOR: ARTHUR ARROBAS MARTINS BARROSO**

**ORIENTADOR: PEDRO LUÍS DA COSTA AGUIAR ALVES**

**COORDENADOR: MARTIN VILA-AIUB**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PEDRO LUÍS DA COSTA AGUIAR ALVES  
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. RICARDO VICTÓRIA FILHO  
Departamento de Produção Vegetal / ESALQ/USP / Piracicaba/SP

Prof. Dr. CAIO ANTONIO CARBONARI  
Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal / FCA / UNESP - Botucatu

Prof. Dr. RUBEM SILVERIO DE OLIVEIRA JUNIOR  
Departamento de Agronomia / UEM / Maringá/PR

Prof. Dr. LEONARDO BIANCO DE CARVALHO  
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 18 de julho de 2017

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**ARTHUR ARROBAS MARTINS BARROSO:** Nascido em 29 de julho de 1988, na cidade de Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brasil, filho de Maria do Carmo Arrobas Martins Azevedo e Paulo Rodrigues Barroso Filho. Graduiu-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Estadual Paulista - UNESP, em 2012. Durante sua graduação, foi estagiário do Laboratório de Plantas Daninhas – LAPDA, e da Dow AgroSciences, sendo bolsista Fapesp pelo período de três anos. Em 2014, iniciou seu mestrado em Ciências (Fitotecnia) na Universidade de São Paulo (USP), sendo bolsista Fapesp pelo período de dois anos. Em 2016, ingressou no curso de doutorado em Produção Vegetal pela UNESP, sendo bolsista CNPq pelo período de três anos, com bolsa-sanduíche realizada na Universidad de Buenos Aires - UBA, Argentina, por quatro meses. Desde 2007 trabalha com biologia e resistência de plantas daninhas a herbicidas. Publicou artigos científicos, resumos e participou de Congressos nos últimos anos. Orientou alunos de graduação, participou de bancas de TCC, organizou eventos e revisou artigos de revistas científicas, como Planta Daninha, Revista Brasileira de Herbicidas e Weed Science. Foi representante de alunos da pós-graduação da Comissão Permanente de Pesquisa da Unesp de Jaboticabal, durante dois anos e Vice-Coordenador do Comitê de Apoio aos Estudantes da Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas - SBCPD. Recebeu no último Congresso Brasileiro da Ciências das Plantas Daninhas premiações por sua apresentação e por seu trabalho desenvolvido nos últimos anos.

**EPÍGRAFE**

As conquistas científicas só servem se estão a serviço do povo

Ramón Carrillo

## AGRADECIMENTOS

Ao **amor**.

À **minha família**, Maria do Carmo Arrobas Martins Azevedo, Paulo Rodrigues Barroso Filho (*in memoriam*), Fernando Oliveira de Azevedo e Amanda Arrobas Martins Barroso, que é a base de minha vida.

À **Júlia Leite**, minha noiva, por participar desta história.

Ao meu orientador, professor **Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves**, não apenas pela orientação, mas também pela confiança, amizade e incentivo em minha formação profissional desde a graduação.

Ao professor **Dr. Dagoberto Martins**, pela orientação no primeiro ano e pelos ensinamentos passados.

Ao meu coorientador, professor **Dr. Martin Vila-Aiub**, pela orientação e disponibilidade; e à **Universidade de Buenos Aires - UBA**, por todas as condições cedidas na realização deste trabalho.

Aos pesquisadores e professores **Dr. Silvano Bianco**, **Dra. Mariluce Pascoína Nepomuceno** e **Dr. Marcos Antônio Kuva**, pelas sugestões na banca de qualificação.

À **Universidade Estadual Paulista - Unesp**, e ao programa de **Pós-Graduação em Produção Vegetal**, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV, de Jaboticabal, pela oportunidade de realizar este curso.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq**, pelo apoio financeiro (Proc.nº 140943/20145).

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia** (Produção Vegetal), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- FCAV, de Jaboticabal, pelos ensinamentos.

Aos **funcionários do Departamento de Produção Vegetal**, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV, de Jaboticabal, pelo apoio e convivência, especialmente à pessoa de **José Martins Fidelis**, por seu profissionalismo.

Aos amigos do **Laboratório de Plantas Daninhas** – LAPDA, pela ajuda para a realização deste trabalho, pela amizade, paciência, ajuda e companheirismo ao longo desses anos.

Ao **Laboratório de Matologia/NUPAM**, da Faculdade de Ciências Agrônomicas - FCA, de Botucatu, em especial na pessoa do professor **Dr. Caio Antônio Carbonari**, pelo auxílio e atenção dispensada.

Ao professor **Vitório Barato Neto**, pela adequação deste trabalho às novas normas da língua portuguesa.

A todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram na realização desta pesquisa e que por ventura eu tenha-me esquecido.

**Muito obrigado!**

## SUMÁRIO

RESUMO .....	ix
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	2
Plantas daninhas e herbicidas.....	2
Resistência a herbicidas .....	4
Adaptabilidade ecológica ou Fitness .....	6
O azevém e o capim-pé-de-galinha.....	7
Proteômica.....	10
OBJETIVOS .....	11
REFERÊNCIAS .....	12
CAPÍTULO 2 – RESISTÊNCIA AO GLYPHOSATE EM PLANTAS DE AZEVÉM: CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS .....	19
INTRODUÇÃO.....	20
MATERIAL E MÉTODOS .....	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
CONCLUSÃO .....	38
REFERÊNCIAS .....	38
CAPÍTULO 3 – EFEITOS DE MUTAÇÕES NA EPSPS NA ADAPTABILIDADE ECOLÓGICA E COMPETITIVA DO CAPIM-PÉ-DE-GALINHA .....	43
INTRODUÇÃO.....	44
MATERIAL E MÉTODOS .....	46
RESULTADOS .....	51
DISCUSSÃO .....	58
CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS .....	61
APÊNCIDE .....	65
APÊNDICE A. Expressão proteica em plantas de azevém resistentes e suscetíveis ao glyphosate antes e após sua aplicação.....	66
APÊNDICE B. Processo de obtenção e de purificação dos genótipos de capim---pé-de- galinha.....	67

## IMPACTO DA RESISTÊNCIA AO GLYPHOSATE EM GENÓTIPOS DE AZEVÉM E CAPIM-PÉ-DE-GALINHA

**RESUMO** – As culturas agrícolas estão sujeitas a conviver com plantas daninhas que podem, em determinadas situações, reduzir seu potencial genético de produção, causando prejuízos. Na maioria das vezes, devido à praticidade e ao custo, essas plantas são controladas pela aplicação de herbicidas, o que se denomina de controle químico. Dentre os produtos utilizados, está o glyphosate, que nos últimos anos vem sendo usado de maneira repetitiva devido à presença quase que exclusiva de culturas tolerantes a esse herbicida, como a soja, o algodão e o milho. Com isso, a utilização desse herbicida vem selecionando, nos últimos anos, plantas que apresentam adaptações para resistir a sua ação, dentre elas o azevém e o capim-pé-de-galinha. A resistência pode ser causada por diferentes mecanismos, envolvendo ou não a enzima-alvo de atuação do herbicida. Para o glyphosate, essa enzima é a 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato, e essa pode apresentar mutações simples ou duplas. Essas mutações, além de afetar a tolerância da planta ao herbicida, podem modificar a fisiologia e o metabolismo da espécie, tornando-a mais ou menos adaptada ecologicamente, o que é denominado de fitness. Este trabalho teve por objetivo estudar os impactos da resistência ao glyphosate nas duas espécies supracitadas. Em um primeiro trabalho, plantas de azevém resistentes ao glyphosate foram comparadas a plantas suscetíveis quanto a seu perfil metabólico e proteico antes e após a aplicação do herbicida. As plantas suscetíveis apresentaram maiores níveis de aminoácidos produzidos derivado da rota do ácido chiquímico e menores teores de glyphosate em suas folhas, 72 horas após a aplicação do herbicida. Observou-se que as plantas suscetíveis apresentaram maior desenvolvimento, maior expressão de proteínas ligadas ao sistema fotossintético do azevém e expressão diferencial de proteínas ligadas à defesa vegetal contra estresses, ausentes nas plantas resistentes. Após a aplicação do herbicida, as plantas suscetíveis morreram, e as resistentes sobreviveram, passando a expressar, também, a enzima EPSPS sintase, sendo esse um dos mecanismos de resistência encontrados para a espécie. Em um segundo trabalho, avaliaram-se, em dois experimentos, os impactos da resistência ao glyphosate, causados por mutações simples ou duplas, no capim-pé-de-galinha, e seus efeitos na cultura da soja. O desenvolvimento e a fecundidade do capim-pé-de-galinha são pouco afetados pela mutação simples na posição 106 da enzima EPSPS, na ausência do glyphosate. Por outro lado, a mutação dupla da enzima nas posições 102 e 106 gera elevados custos no desenvolvimento e na reprodução das plantas. Quando se aplica o herbicida, a situação inverte-se. Plantas com a presença de uma mutação passam a sofrer intoxicação com o herbicida, chegando, inclusive, a morrer, enquanto se observa sobrevivência total de plantas com duplas mutações. Quando em convivência com a soja, na ausência do herbicida, tem-se a cultura mais afetada pela convivência com os genótipos suscetíveis e com uma única mutação. Na presença do herbicida, nas condições observadas, a interferência das plantas de capim-pé-de-galinha foi reduzida.

**Palavras-chave:** *Eleusine indica*, fitness, *Lolium multiflorum*, proteômica, resistência

## GLYPHOSATE RESISTANCE IMPACT IN ITALIAN RYEGRASS AND GOOSEGRASS GENOTYPES

**ABSTRACT** - Crops are subject to live with spontaneous plants that may in certain situations reduce their genetic potential of production, causing losses. Most of the time, due to the practicality and cost, these plants are controlled by the application of herbicides, what is called chemical control. Among the products for this control, there is glyphosate, which in recent years has been used repetitively due to the almost exclusive presence of crops tolerant to this herbicide, such as soybean, cotton and corn. The use of this herbicide has been selecting, therefore in the last years plants that present adaptations to resist its application, among them Italian ryegrass and goosegrass. The resistance can be caused by different mechanisms, involving or not the target enzyme of action of the herbicide. For glyphosate, this enzyme is 5-enolpyruvyl-silicon-3-phosphate and it may present single or double mutations. These mutations, in addition to affecting the tolerance of the plant to the herbicide, can modify the physiology and metabolism of the species, making it more or less ecologically adapted, which is called fitness. The objective of this work was to study the impacts of glyphosate resistance on the two species mentioned above. In a first work, glyphosate resistant Italian ryegrass plants were compared to susceptible plants for their metabolic and protein profile before and after herbicide application. Susceptible plants showed higher levels of amino acids produced from the shikimic acid route and lower levels of glyphosate in their leaves 72 hours after the application of the herbicide. It was observed that the susceptible plants presented greater development, proteins linked to the greater ryegrass physiology expressed and differential expression of proteins bound to vegetal defense against stresses, absent in resistant plants. After the application of the herbicide, the susceptible plants died, and the resistant ones continued their normal physiology and start expressing the EPSPS synthase enzyme, being this one of the mechanisms of resistance found for the species. In a second work, the impacts of resistance to glyphosate, caused by single or double mutations in goosegrass and its effects on soybean crop, were evaluated in two experiments. The development and fecundity of goosegrass is little affected by simple mutation at position 106 of the EPSPS enzyme in the absence of glyphosate. On the other hand, the double mutation of the enzyme at positions 102 and 106, generates high costs in the development and reproduction of plants. When the herbicide is applied, the situation reverses. Plants with the presence of a mutation begin to present phytointoxication with the herbicide. When living with soybeans, in the absence of the herbicide, the culture is most affected by the coexistence with the susceptible genotypes and genotype with a single mutation. In the presence of the herbicide, under the conditions observed, the interference of goosegrass plants was reduced.

**Keywords:** *Eleusine indica*, fitness, *Lolium multiflorum*, proteômica, resistência

## **CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais**

### **INTRODUÇÃO**

A agricultura é a atividade mais impactante no PIB brasileiro. A presença de plantas daninhas no campo impede, muitas vezes, a expressão do pleno potencial genético de plantas cultivadas. As plantas daninhas são controladas na maioria das vezes pelo uso de herbicidas. O uso frequente de herbicidas como única ferramenta de controle seleciona populações resistentes, assim como toda pressão de seleção. A resistência de plantas daninhas é um problema de ordem mundial, sendo que apenas no Brasil são mais de 28 espécies resistentes aos herbicidas registrados. As plantas daninhas podem ser resistentes à herbicidas tanto por mecanismos relacionados ao local de ação, bem como por mecanismos não relacionados ao local de ação. Na primeira categoria estão presentes mutações na enzima alvo onde o herbicida atua, neste caso, na enzima EPSPS. Esta mutação pode ser simples, ou dupla, como ocorre no capim-pé-de-galinha. Ainda, pode ocorrer a superexpressão da enzima alvo, como ocorre em plantas de azevém. Para os mecanismos não relacionados ao local de ação do herbicida, a resistência se dá por processos que impedem/reduzem a absorção e a translocação dos herbicidas. Por fim, podem existir mecanismo que metabolizam os herbicidas. A presença destes mecanismos isoladamente ou em conjunto, pode acarretar modificações fisiológicas e bioquímicas nas plantas daninhas resistentes. Conhecer a biologia desses indivíduos e de sua resistência é essencial para o manejo integrado de plantas daninhas.

## REVISÃO DE LITERATURA

### Plantas daninhas e herbicidas

A história das plantas daninhas acompanha a história agricultura. Estes organismos vegetais destacaram-se ao passo que passaram a interferir nas atividades do homem. Plantas daninhas são, portanto, por definição, espécies que crescem espontaneamente em solos agrícolas e/ou em outras áreas de interesse onde não são desejadas (SILVA et al., 2007). Essa presença indesejada decorre muitas das vezes quando se observa que a planta cultivada sofre efeitos negativos em seu crescimento, desenvolvimento e produtividade. A soma desses efeitos denomina-se interferência (MULLER, 1969).

A interferência pode ser direta e/ou indireta. A interferência direta dá-se na menor produtividade vegetal ou animal obtida, na menor qualidade do produto final e na não certificação de sementes. Por interferência indireta, entende-se a menor eficiência no uso da área, a hospedagem de pragas e doenças por plantas daninhas, a menor eficiência do trabalho humano, a obstrução de canais de irrigação, o abrigo de animais peçonhentos, dentre outros (SWANTON; NKOA; BLACKSHAW, 2015).

A competição é a principal interferência direta das plantas daninhas nas culturas agrícolas e pode ocorrer por nutrientes minerais essenciais, luz, água e/ou espaço (BIANCHI; FLECK; LAMEGO, 2006). A competição em si pode ser definida como o recrutamento conjunto, por duas ou mais plantas, de recursos essenciais ao seu crescimento e desenvolvimento, os quais são limitados no ecossistema comum (PITELLI, 2014). Já por alelopatia, entendem-se as interações químicas benéficas e prejudiciais entre plantas e microrganismos. Diferentemente da competição, nesse caso, não são extraídos elementos do meio e, sim, inseridos (MOLISCH, 1937).

O impacto da presença de plantas daninhas varia conforme a cultura e a comunidade infestante presente, dentre outros fatores. Estimam-se reduções de 20% de alimentos produzidos no mundo devido à interferência (OERKE, 2006). No

último ano, as plantas daninhas causaram prejuízos da ordem de 28 bilhões de dólares nos Estados Unidos e no Canadá (SOLTANI et al., 2016).

A convivência de culturas com as plantas daninhas é inevitável, e diminuir a interferência depende da condução de um equilíbrio em favor das plantas cultivadas. Para isso, iniciou-se, na década de 30, o controle de plantas daninhas a partir do uso de moléculas orgânicas, denominadas de herbicidas. Em meados da Segunda Guerra Mundial, o descobrimento do herbicida 2,4-D e sua ação de controle, apenas para folhas-largas, alavancaram o uso desses produtos (PETERSON, 1967). Estima-se que as vendas de herbicidas ultrapassem 50 bilhões de dólares anuais. O uso de herbicidas passou a ser a medida mais utilizada no controle de plantas daninhas, pois esses passaram a proporcionar agilidade e eficiência ao sistema de produção, contribuindo assim para maior rentabilidade econômica do produtor (FOLONI, 2014; KRAEHMER, 2012).

Dentre os herbicidas utilizados, o glyphosate [N-(fosfometil) glicina] é o mais consumido no mundo, destacando-se em virtude de sua alta eficácia no controle de espécies vegetais anuais e perenes e seu baixo custo. Apresenta ainda boas características ambientais, como rápida ligação com as partículas do solo, rápida biodegradação e baixa toxicidade a mamíferos, aves e peixes (NEUMANN et al., 2006; PRESTON; WAKELIN, 2008).

O mecanismo de ação do herbicida glyphosate é atribuído à inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3 fosfato sintase (EPSPS), interrompendo a síntese dos aminoácidos essenciais fenilalanina, tirosina e triptofano, que são precursores de produtos como lignina, alcaloides, flavonoides e ácidos benzoicos, indispensáveis para a síntese de proteínas e para o crescimento de plantas (REDDY et al., 2008). O glyphosate pode ainda afetar diretamente a fotossíntese da planta, reduzindo a atividade da ribulosebifosfatocarboxilase/oxigenase (RUBISCO), diminuindo a síntese de clorofila e interferindo na organização do aparelho fotossintético (AHSAN et al., 2008). Como resultado, tem-se um declínio no total de proteínas, cofatores enzimáticos, metabólitos secundários e fotossíntese, resultando na morte da planta (DUKE; POWLES, 2008).

## Resistência a herbicidas

Os sistemas de produção de alta tecnologia, cultivados em grandes áreas, fazem quase que exclusivamente o controle de plantas daninhas pelo uso de herbicidas, entre os quais o glyphosate. Desde sua introdução, os herbicidas sintéticos impuseram forte pressão de seleção em espécies daninhas, e, como resultado, a resistência a herbicidas evoluiu de maneira acelerada em todo o mundo (POWLES; YU, 2010).

O primeiro relato de uma planta daninha resistente a herbicidas ocorreu para compostos orgânicos em 1957 (SWITZER, 1957). Menos de 30 anos depois, havia mais de 100 espécies relatadas como resistentes em aproximadamente 40 países. Atualmente, existem 478 casos únicos de resistência, sendo 252 espécies que apresentam resistência a um ou mais mecanismos de ação de herbicidas. No Brasil, existem 43 casos de plantas daninhas resistentes a herbicidas, sendo oito espécies resistentes ao glyphosate (HEAP, 2017).

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é definida como a “habilidade natural e herdável de uma planta sobreviver e reproduzir-se em uma dose de herbicida considerada letal a indivíduos normais (suscetíveis) de uma mesma espécie” (WSSA, 1998). A origem da resistência vem da seleção de plantas daninhas pelos herbicidas. Segundo Darwin (s.d.), os indivíduos mais aptos a sobreviver em determinadas condições eram aqueles que se adaptavam a elas, exatamente o que ocorre para essas plantas. A aplicação de doses acima ou abaixo das recomendadas pode selecionar plantas daninhas resistentes. A este uso incorreto, soma-se o uso frequente de um mesmo herbicida ou mecanismo de ação ou, ainda, de uma mesma rota de metabolização (NEVE et al., 2014; MANALLIL et al., 2011).

As plantas daninhas apresentam resistência devido a diversos mecanismos, que podem ser divididos em dois tipos. Aqueles que envolvem o sítio de ação do herbicida (mecanismos-alvo) e aqueles que reduzem a quantidade de herbicida que chega no sítio de ação (não alvos). Dentre os mecanismos-alvo, está a mutação em bases nitrogenadas de sequências gênicas responsáveis pela produção de enzimas,

onde o herbicida atuará, e pela superexpressão dessas enzimas. No primeiro caso, diminui-se a afinidade do herbicida para com a enzima e, com isso, tem-se reduzido ou anulado o efeito do herbicida na planta. No segundo, a planta sobrevive devido ao mesmo motivo; porém, neste caso, pela quantidade insuficiente do herbicida para inativar todas as enzimas produzidas (HEALY-FRIED et al., 2007; GAINES et al., 2010).

Para o glyphosate, na maioria dos casos, a mutação de bases nitrogenadas ocorre em geral na posição 106 do gene responsável pela produção da enzima EPSPs, onde um aminoácido Prolina é substituído por Alanina, Leucina, Serina ou Treonina ou pela dupla mutação na enzima, nas posições 102 e 106, onde uma Treonina é substituída por uma Isoleucina, e uma Prolina, por uma Serina (TIPS) (YU et al., 2015; HEAP, 2017). A superexpressão de enzimas só foi detectada para a EPSPs como mecanismo de resistência ao glyphosate (HEALY-FRIED et al., 2007; GIACOMINI; PHILIP; WARD, 2014).

Dentre os mecanismos-não alvo, estão aqueles que excluem o herbicida do seu sítio de ação. A translocação diferenciada foi um dos primeiros mecanismos relatados para o glyphosate (LORRAINE-COLWILL et al., 2002). Esta translocação, na maioria das vezes, está associada ao sequestro do herbicida no vacúolo de células (GE et al., 2011). Em outros casos, a translocação pode também ser reduzida em plantas devido à menor absorção do produto, que devido a fatores morfológicos apresentados nas plantas resistentes (MICHITTE et al., 2007). A translocação reduzida parece impactar de maneira mais significativa a tolerância ao herbicida glyphosate do que a mutação da EPSPs (WAKELIN; PRESTON, 2006).

Outra possível causa da redução do ativo na planta deve-se à metabolização do herbicida a substâncias menos tóxicas ou a substâncias que passam a ser degradadas por enzimas. No caso do glyphosate, este é metabolizado em sarcosina ou em ácido aminometilfosfônico (CARVALHO et al., 2012).

Ainda com relação a mecanismos que reduzem a translocação do herbicida, algumas plantas de *Ambrosia trifida* (Giant ragweed) impedem a translocação do herbicida pela rápida necrose de folhas e pela morte celular. Após 12 horas de tratadas, as folhas de plantas resistentes secam e morrem, impedindo que o herbicida se transloque (ROBERTSON, 2010).

## Adaptabilidade ecológica ou Fitness

A adaptabilidade ecológica (ou fitness) de uma planta ou de uma população é a probabilidade desta em desenvolver-se e perpetuar-se frente a outras. Como a resistência é resultado de mutações de bases nitrogenadas nas sequências gênicas produtoras das enzimas, tem-se, na maioria das plantas resistentes, a desregulação das vias bioquímicas do vegetal, podendo este ter alterada sua proteção, fisiologia, produção de sementes, etc. (POWLES; HOLTUM, 2001).

Um dos mecanismos de resistência em plantas daninhas dá-se pela substituição de aminoácidos, o que pode alterar modificações estruturais em enzimas-alvo, como a EPSPS (GALEANO et al., 2016). Porém, dessas alterações, resulta muitas vezes o comprometimento da eficiência enzimática, seja em sua função, seja em sua cinética, o que irá comprometer a formação de aminoácidos e o desenvolvimento da planta (DÉLYE, 2005; TRANEL; WRIGHT, 2002). Uma das possíveis explicações para a demora do relato de casos de resistência ao glyphosate decorre da alta penalidade de fitness de plantas resistentes e suas modificações enzimáticas, se comparado, por exemplo, com as mutações possíveis da resistência aos herbicidas inibidores da ALS (PRESTON, 2009).

O mesmo ocorre para mecanismos-não alvos de resistência. Por exemplo, tem-se na resistência de plantas daninhas por metabolização de produtos a necessidade da produção elevada da enzima P450. Como essa enzima é constitutiva, necessita-se de quantidades adicionais de energia e de recursos que são investidos pelo vegetal. Esses recursos são desviados do crescimento e da reprodução da planta, e podem, também, limitar o desenvolvimento da planta (VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009)

Os alelos que conferem resistência de plantas daninhas aos herbicidas passam por um trajeto evolucionário, sofrendo a pressão combinada de diversos fatores ecológicos que irão, conjuntamente, definir o benefício de resistência ou o custo da resistência (MAXWELL; MORTIMER, 1994; SIMMS; RAUSHER, 1987). O benefício de resistência (BR) é definido como a sobrevivência e a fecundidade de uma planta resultante da resistência do genótipo frente à seleção com o herbicida. É

uma medida da eficiência bioquímica que protege a planta do dano causado pelo herbicida (VILA-AIUB et al., 2015).

Já o custo de resistência (CR) é medido pela ausência do herbicida. Em geral, espera-se que as plantas que carregam alelos responsáveis por gerar indivíduos resistentes, sofram um corte ou um custo em seu pleno desenvolvimento, de maneira a suplementar o gasto com o benefício de resistência, sendo assim realizado um *trade-off* dentro da planta (VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009).

Conhecer o benefício de fitness e o custo da resistência de determinada espécie faz-se fundamental no manejo da resistência de plantas daninhas a herbicidas. Plantas que apresentem alto benefício de fitness e baixo custo de resistência irão apresentar rápida evolução no campo. Ao contrário, aquelas que apresentam baixo benefício de fitness e alto custo de resistência, tendem a ter crescimento limitado no ambiente (VILA-AIUB et al., 2015).

Com relação ao herbicida glyphosate, são poucos os estudos de comparação do benefício e do custo da resistência de plantas daninhas. Em geral, a translocação reduzida do herbicida, bem como a superexpressão enzimática da EPSPS parecem não exercer efeitos sobre o desenvolvimento vegetal de plantas resistentes (VILA-AIUB et al., 2014; PEDERSEN et al., 2007). Por outro lado, a resistência causada por mutações na EPSPS, principalmente pela dupla mutação (TIPS), reduz o desenvolvimento de plantas na ausência de herbicidas (YU et al., 2015).

## **O azevém e o capim-pé-de-galinha**

Dentre os casos de resistência a herbicidas registrados atualmente, observa-se crescente preocupação quanto à seleção de plantas daninhas da família Poaceae, conhecidas por gramíneas, sendo essa a família com maior número de casos de resistência (HEAP, 2017). Dentro das gramíneas, duas plantas presentes no Brasil ocupam posição de destaque quanto a danos conhecidos e a danos potenciais, sendo o azevém, na região Sul do Brasil, e o capim-pé-de-galinha, caso recém-registrado de resistência ao glyphosate no País.

O azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) é uma espécie da família Poaceae e originária da bacia do Mediterrâneo, que se espalhou para a Europa e, posteriormente, para a América do Norte (NELSON et al., 1997). No Brasil, esta espécie foi introduzida, provavelmente, no Sul por colonos italianos (SILVA et al., 2014). O azevém é uma gramínea anual, rústica, cespitosa, agressiva e adaptada a baixas temperaturas em climas mesotérmicos (DERPSCH; CALEGARI, 1992).

Essa espécie passou a ser utilizada como forrageira para formação de palha no sistema de plantio direto, sendo dessecada há mais de vinte anos pelo uso do glyphosate. Porém, com o uso indiscriminado e repetitivo do herbicida, genótipos resistentes foram selecionados. Esse fato tem-se constituído em um grande problema nas lavouras de soja transgênica, tolerante ao glyphosate, de trigo e em pomares do Rio Grande do Sul, elevando os custos de produção (VARGAS et al., 2004).

O primeiro caso de azevém resistente ao glyphosate no mundo foi descrito por Perez e Kogan (2002), em pomares no Chile. Dois anos depois, no Brasil, confirmou-se a presença de populações resistentes em lavouras anuais no Rio Grande do Sul (ROMAN et al., 2004). A resistência de azevém ao glyphosate é composta por mais de um mecanismo de resistência. Entre os mecanismos observados, estão a mutação na enzima EPSPS bem como sua superexpressão (SALAS et al., 2012; NANDULA et al., 2007) e a translocação diferencial do herbicida nos diferentes genótipos (FERREIRA et al., 2006). Segundo Galvan et al. (2012), não foram encontradas diferenças na anatomia foliar entre genótipos, descartando-se, então, possíveis problemas de absorção do herbicida.

Com relação a penalidades em seu desenvolvimento causadas pela resistência ao glyphosate, nota-se que plantas suscetíveis apresentam maior desenvolvimento frente a plantas resistentes devido ao maior perfilhamento de plantas. Ainda, o genótipo suscetível apresenta início do período reprodutivo cerca de 20 dias antes do genótipo resistente, completando, antes, seu ciclo (VARGAS et al., 2004). Devido a isso, o genótipo suscetível apresenta vantagens competitivas (FERREIRA et al., 2008). Não se sabe, porém, quais os processos afetados nas plantas resistentes que geram esse menor desenvolvimento, sendo supostos

mecanismos de fotossíntese e do uso da água (CONCENÇO et al., 2008). Esclarecer melhor esses processos é um dos objetivos do presente trabalho.

O capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica* [L]. Gaertn.), diferentemente do azevém, é uma espécie disseminada por todo o território nacional, sendo considerada infestante em diversos cultivos. O centro de origem dessa espécie ocorre na Ásia e na Malásia. É uma gramínea de ciclo anual, de fisiologia do tipo C4, cosmopolita, ruderal e frequentemente encontrada em cultivos anuais e perenes (BOLDRINI; LANGUI-WAGNER; BOECHAT, 2005). Sua alta taxa de distribuição deve-se principalmente por ser uma espécie que produz elevado número de sementes por planta (em torno de 40.000) e por apresentar baixas exigências nutricionais para seu desenvolvimento, estabelecendo-se ainda em solos com diferentes níveis de pH e salinidade (KISSMANN, 2007). É uma planta bastante competitiva, acarretando frequentemente problemas na produtividade de culturas, principalmente se convivendo com a cultura desde o início de seu ciclo (BARROSO; YAMAUTI; ALVES, 2010).

O primeiro registro da resistência da espécie ao herbicida glyphosate ocorreu em 1997, na Malásia, sendo registrados casos posteriores na Colômbia, Bolívia, China, Costa Rica, Estados Unidos, Argentina, Indonésia, Japão e, finalmente, em 2016, no Brasil (HEAP, 2017). Com relação aos mecanismos de resistência encontrados até agora para a planta, não foram relatados problemas quanto à absorção/translocação/metabolização do herbicida. Em todos os casos, o problema encontrado está relacionado a mecanismos-alvo de resistência, consequência da mutação de bases nitrogenadas na sequência gênica da EPSPS (BAERSON et al., 2002).

Com relação às mutações encontradas, as plantas podem apresentar apenas uma mutação pontual na Prolina 106 (P106S), conhecida por gerar baixos níveis de resistência ao herbicida glyphosate, ou apresentar duas mutações na enzima EPSPS, nas posições 102 e 106, substituindo-se uma Treonina por uma Isoleucina e uma Prolina por uma Serina (TIPS), respectivamente. Essa segunda mutação na enzima, supostamente, ocorre em plantas em sequência da mutação P106 (YU et al., 2015).

Não se sabe até o momento os custos de resistência que esses diferentes genótipos apresentam, mas sugere-se uma alta penalidade de desenvolvimento de plantas na ausência do glyphosate com a dupla mutação (YU et al., 2015). No Brasil, foram identificados apenas eventos de resistência do tipo P106 (HEAP, 2017). Sendo assim, é de extrema importância avaliar o desenvolvimento das plantas com a presença das diferentes mutações em clima brasileiro e conhecer sua competitividade a fim de fornecer subsídios para um manejo integrado dessas populações.

## **Proteômica**

A proteômica pode ser definida como o estudo da composição proteica total de um organismo, célula ou organela que permite identificar e compreender as proteínas e suas funções. Diferente do que acontece com o genoma, um único organismo pode apresentar diversos proteomas, os quais mudam, espacialmente e temporalmente, durante seu desenvolvimento. A análise proteômica de plantas, permite avaliar quantitativamente e qualitativamente as proteínas influenciadoras do sistema celular e as respostas do perfil bioquímico vegetal causadas por seu crescimento e a interação desse com o ambiente (Agrawal et al., 2011).

Pela proteômica, complexas questões biológicas tornaram-se muito estudadas, especialmente em decorrência do rápido desenvolvimento das técnicas de identificação e quantificação proteica. Tais técnicas têm permitido o estudo simultâneo de quantidade enorme de proteínas expressas em uma célula, em um determinado momento (Haynes; Roberts, 2007).

A proteômica é um campo emergente de estudo, principalmente de estudos ligados à ciência das plantas daninhas, porém seu uso mostra-se promissor no esclarecimento de questões relacionadas aos herbicidas. Em 2017, Gonzalez-Torralva et al. (2017), utilizaram a proteômica para avaliar proteínas candidatas a influenciar a tolerância de plantas daninhas de *Conyza canadensis* ao herbicida glyphosate. Segundo os autores, após a aplicação do herbicida, encontraram-se três

grupos de proteínas diferencialmente expressas, sendo essas a ATP sintase, a frutose-bifosfato aldolase e uma proteína desconhecida. Nesse caso, relacionou-se a proteína frutose-bifosfato aldolase com a translocação diferencial do glyphosate nas plantas e a ATP sintase com a necessidade extra de energia requerida pelas plantas resistentes devido à seus mecanismos de translocação de herbicidas para o vacúolo.

Essas análises podem também ser utilizadas para verificar os efeitos de herbicidas em culturas de interesse. Na soja, por exemplo, buscou-se pelo uso da proteômica comparativa, a seleção de plantas tolerantes a herbicidas do grupo das sulfoniluréias. Encontraram-se proteínas diferencialmente expressas com relação ao metabolismo energético, defesa da planta frente à estresses, e processos ligados a síntese e armazenamento de compostos. Ainda nesse estudo, a expressão semelhante da enzima ALS (sítio de ação do herbicida aplicado), ressaltou que mecanismos de tolerância nesse caso específico, não estão ligadas a seletividade da cultura (Yu et al., 2017). Ainda para herbicidas, plantas de *Arabidopsis thaliana*, submetidas a aplicação de imazethapyr, tiveram seu crescimento inibido, produzindo maiores quantidades de antocianinas e espécies reativas de oxigênio, enquanto o sistema de transporte de elétrons encontrava-se altamente protegido (Sun et al., 2016). Segundo Vivancos et al. (2011), a soja submetida tolerante ao glyphosate, submetida à aplicação desse herbicida mesmo tendo suportado os efeitos do produto, passou a apresentar deficiências na produção de proteínas ligadas a defesa da planta, o que a torna mais sensível ao ataque de pragas e patógenos.

## **OBJETIVO GERAL**

Este trabalho teve por objetivo geral identificar as consequências de diferentes mecanismos de resistência na adaptabilidade ecológica das plantas daninhas de azevém e capim-pé-de-galinha.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar mecanismos responsáveis pela resistência ao glyphosate em plantas de azevém.
- Identificar proteínas diferencialmente expressas anterior e posteriormente à aplicação do glyphosate em plantas de azevém, relacionando-as com os mecanismos previamente estabelecidos.
- Quantificar os impactos da resistência causada por mutações na EPSPS em plantas de capim-pé-de-galinha sobre seu crescimento, sobrevivência e reprodução, sob influência ou não da aplicação de glyphosate e/ou da convivência com a soja.
- Quantificar os danos causados por diferentes genótipos do capim-pé-de-galinha na soja, na presença e ausência do herbicida glyphosate.

## REFERÊNCIAS

AGRAWAL, G. K.; BOURGUIGNON, J.; ROLLAND, N.; EPHRITIKHINE, G.; FERRO, M.; JAQUINOD, M.; ALEXIOU, K.G.; CHARDOT, T.; CHAKRABORTY, N.; JOLIVET, P.; DOONAN, J.H.; RAKWAL, R. Plant organelle proteomics: Collaborating for optimal cell function. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 30, p. 772- 853, 2011.

AHSAN, N.; LEE, D. G.; LEE, K. W.; ALAM, I.; LEE, S. H.; BAHK, J. D.; LEE, B. H. Glyphosate-induced oxidative stress in Rice leaves revealed by proteomic approach. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 1062-1070, 2008.

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

BARROSO, A. A. M.; YAMAUTI, M. S.; ALVES, P. L. C. A. Interferência entre espécies de planta daninha e duas cultivares de feijoeiro em duas épocas de semeadura. **Bragantia**, v. 69, p. 609-616, 2010.

BIANCHI, M. A.; FLECK, N. G.; LAMEGO, F. P. Proporção entre plantas de soja e plantas competidoras e as relações de interferência mútua. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1.380-1.387, 2006.

BOLDRINI, I. I.; LONGHI-WAGNER, H. M.; BOECHAT, S. de C. **Morfologia e taxonomia de gramíneas sul-riograndenses**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. p. 96.

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

CONCENÇO, G.; FERREIRA, E. A.; SILVA, A. A.; GALON, L.; REIS, M. R.; D'ANTONINO, L.; VARGAS, L.; SILVA, L. V. B. D. Fotossíntese de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) em condições de competição. **Planta Daninha**, v. 25, p. 595-600, 2007.

DÉLYE, C.; ZHANG, X. Q.; MICHEL, S.; MATEJICEK, A.; POWLES, S. B. Molecular bases for sensitivity to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in blackgrass. **Plant Physiology**, v. 137, p. 794–806, 2005.

DERPSCH, R.; CALEGARI, A. **Plantas para adubação verde no inverno**. Londrina: IAPAR, 1992. 80p. (IAPAR. Circular, 73).

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

FERREIRA, E. A.; CONCENÇO, G.; SILVA, A. A.; REIS, M. R.; VARGAS, L.; VIANA, R. G.; GUIMARÃES, A. A.; GALON, L. Potencial competitivo de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*). **Planta Daninha**, v. 26, p. 261-269, 2008.

FERREIRA, E. A.; SANTOS, J. B.; SILVA, A. A.; OLIVEIRA, J. A.; VARGAS, L. Translocação do glyphosate em biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*). **Planta Daninha**, v. 21, p. 365-370, 2006.

FOLONI, L. L. Manejo de Plantas Daninhas em Sistemas Conservacionistas. In: MONQUERO, P. A. (Ed1.). **Manejo de Plantas Daninhas nas Culturas Agrícolas**. São Carlos, 2014. p. 1-30.

GAINES, T. A. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 107, p. 1029–1034, 2010.

GALEANO, E.; BARROSO, A. A. M.; VASCONCELOS, T. S.; LÓPEZ-RUBIO, A.; ALBRECHT, A. J. P.; VIVTORIA-FILHO, R.; CARRER, H. EPSPS variability, gene expression, and enzymatic activity in glyphosate-resistant biotypes of *Digitaria insularis*. **Genetic and Molecular Research**, v. 15, p. 1-15, 2016.

GALVAN, J.; RIZZARDI, M. A.; CARNEIRO, C. M.; BIANCHI, M. A. Anatomia foliar de *Lolium multiflorum* sensível e resistente ao glyphosate. **Planta Daninha**, v. 30, p. 407-413, 2012.

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

GIACOMINI, D.; PHILIP, W.; 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.

GONZÁLEZ-TORRALVA, F.; BROWN, A. P.; CHIVASA, S. Comparative proteomic analysis of horseweed (*Conyza canadensis*) biotypes identifies candidate proteins for glyphosate resistance. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

HAYNES, P. A.; ROBERTS, T. H. Subcellular shotgun proteomics in plants: Looking beyond the usual suspects. **Proteomics**, v. 7, p. 2963–2975, 2007.

HEALY-FRIED, M. L.; FUNKE, T.; PRIESTMAN, M. A.; HAN, H.; SCHONBRUNN, E. Structural basis of glyphosate tolerance resulting from mutations of Pro (101) in *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n.32, p. 949–955, 2007.

HEAP. **The international survey of herbicide resistant weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org>>; Acesso em: 25 maio 2017.

KISSMANN, K. G. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF, 2007. CD-ROM.

KRAEHMER, H. Innovation: changing trends in herbicide discovery. **Outlooks on Pest Management**, v. 23, p. 115-118, 2012.

LORRAINE-COLWILL, D. F.; POWLES, S. B.; HAWKES, T. R.; HOLLINSHEAD, P. H.; WARNER, S. A. J.; PRESTON, C. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 74, p. 62–72, 2002.

MANALIL, S.; BUSI, R.; RENTON, M.; POWLES, S. B. Rapid evolution of herbicide resistance by low herbicide dosages. **Weed Science**, v. 59, p. 210–217, 2011.

MAXWELL, B.; MORTIMER, A. Selection for herbicide resistance. In: POWLES, S. B.; HOLTUM, J. A. M. **Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry**. Boca Raton: Lewis, 1994. p. 1–25.

MICHITTE, P.; DE PRADO, R.; ESPINOZA, N.; RUIZ-SANTAELLA, J. P.; GAUVRIT, C. Mechanisms of resistance to glyphosate in a ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. **Weed Science**, v. 55, p. 435–440, 2007.

MOLISCH, H. **Der einflusseinerplanze auf die andere - Allelopathie**. Jena:Germay, 1937. p. 116.

MULLER, C.H. Allelopathy as a factor ecological process. **Vegetatio**, v 18, p. 348-357, 1969.

NANDULA, V. K.; POSTON, D. H.; EUBANK, T. W.; KOGER, C. H.; REDDY, K. N. Differential response to glyphosate in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) populations from Mississippi. **Weed Technology**, v. 21, p. 477–482, 2007.

NELSON, L. R.; PHILLIPS, T. D.; WATSON, C. E. Plant breeding for improved production in annual ryegrass. In: ROUQUETTE, F. M.; NELSON, L. R. (Ed). **Ecology, production, and management of Lolium for forage in the USA**. Madison: Crop Science Society of America, 1997. p. 1-14.

NEUMANN, G.; KOHLS, S.; LANDSBERG, E.; SOUZA, T. O.; YAMADA, T.; ROMHELD, V. Relevance of glyphosate transfer to non-target plants via the rhizosphere. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 20, p. 963-970, 2006.

NEVE, P.; BUSI, R.; RENTON, M.; VILA-AIUB, M. M. Expanding the eco-evolutionary context of herbicide resistance research. **Pest Management Science**, v. 70, p. 1385-1393, 2014.

OERKE, E.C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 144, p. 31-41, 2006.

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

PEREZ, A.; KOGAN, M. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. **Weed Research**, v. 43, p.12-19, 2002.

PETERSON, G. The Discovery and development of 2,4-D. **Agricultural History**, v. 41, p. 243-254, 1967.

PITELLI, R. A. Competição entre plantas daninhas e plantas cultivadas. In: MONQUERO, P. **Aspectos da Biologia e Manejo das Plantas Daninhas**. São Carlos: 2014. p. 400.

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

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.; HOLTUM, J. A. M. **Herbicide Resistance in Plants**. Biology and Biochemistry. Lewis:Boca Raton, 2001, 353p.

PRESTON, C.; WAKELIN, A. M. Resistance to glyphosate from altered herbicide translocation patterns. **Pest Management Science**, v. 64, p. 372–376, 2008.

REDDY, K. N.; RIMANDO, A. M.; DUKE, S. O.; NANDULA, V. K. Aminomethylphosphonic acid accumulation in plant species treated with glyphosate. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p. 2125-2130, 2008.

ROBERTSON, R. R. **Physiological and biochemical characterization of glyphosate resistant *Ambrosia trifida* L.** 2010. 70f. Dissertação de Mestrado – Purdue University, West Lafayette, 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, A. R.; 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.

SILVA, D. V.; FERREIRA, E. A.; CONCENÇO, G.; VARGAS, L.; SILVA, A. A.; GALON, L. Resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao glyphosate. In: AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. (Ed.). **Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas no Brasil**. Pelotas: UFPEL, 2014. 398p.

SILVA, A. A.; FERREIRA, F. A.; FERREIRA, L. R.; SANTOS, J. B. Biologia de plantas daninhas. In: SILVA, A. A.; SILVA, J. F. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 318p.

SIMMS, E. L.; RAUSHER, M. D. Costs and benefits of plant-resistance to herbivory. **American Naturalist**, v. 130, p. 570-581, 1987.

SOLTANI, N. J.; DILLE, A.; BURKE, I. C.; EVERMAN, W. J.; VANGESSEL, M. J.; DAVIS, V. M.; SIKKEMA, P. H. Potential corn yield losses due to weeds in north America. **Weed Technology**, v. 30, p. 979-984, 2016.

SUN, C.; CHEN, S.; JIN, Y.; SONG, H.; RUAN, S.; FU, Z.; ASAD M.A.; QIAN, H. Effects of the herbicide imazethapyr on photosynthesis in PGR5 and NDH-deficient *Arabidopsis thaliana* at the biochemical, transcriptomic, and proteomic levels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 4497-4505, 2016.

SWANTON, C.J.; NKOA, R.; BLACKSHAW, R. E. Experimental methods for crop-weed competition studies. **Weed Science**, v. 63, p. 2-11, 2015.

SWITZER, R. C. M. The existence of 2,4-D-resistant strains of wild carrot. In: proceedings of 11th Northeast Weed Control Conference, 1957, New York. **Resumos...**Northeastern Weed Science Society, 1957. p. 153.

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.

VARGAS, L.; ROMAN, E. S.; RIZZARDI, M. A.; SILVA, V. C. Identificação de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) resistentes ao herbicida glyphosate em pomares de maçã. **Planta Daninha**, v. 22, p. 617-622, 2004.

VILA-AIUB, M. M.; YU, Q.; HAN, H.; POWLES, S. B. Effect of herbicide resistance endowing Ile-1781-Leu and Asp-2078-Gly ACCase gene mutations on ACCase kinetics and growth traits in *Lolium rigidum*. **Journal of Experimental Botany**, v. 15, p. 4711-4718, 2015.

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. 793-801, 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.

VIVANCOS, P. D DRISCOLL, S. P.; BULMAN, C. A.; YING, L.; EMAMI, K.; TREUMANN, A.; MAUVE, C.; NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Perturbations of amino acid metabolism associated with glyphosate-dependent inhibition of shikimic acid metabolism affect cellular redox homeostasis and alter the abundance of proteins involved in photosynthesis and photorespiration. **Plant Physiology**, v. 157, p. 256-268, 2011.

WAKELIN, A. M.; PRESTON, C. A target-site mutation is present in a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population. **Weed Research**, v. 46, p. 432-440, 2006.

WSSA. Weed Science Society of America, Technology Notes. **Weed Technology**, v. 2, p. 789-790, 1998.

YU, X.; YANG, A.; JAMES, A. T. Selecting soybeans for sulfonylurea herbicide tolerance: a comparative proteomic study of seed germinations. **Crop & Pasture Science**, v. 68, p. 27-32, 2017.

YU, Q.; JALALUDIN, A.; HAN, H.; CHEN, M.; SAMMONS R. D.; POWLES, S. B. Evolution of a double amino acid substitution in the EPSP synthase in *Eleusine indica* conferring high level glyphosate resistance **Plant Physiology**, v. 4, p. 1440-1447, 2015.

## **CAPÍTULO 2 – Resistência ao glyphosate em plantas de azevém: Causas e consequências**

**RESUMO** - A interferência de plantas daninhas reduz o potencial produtivo das culturas. Dentre os métodos utilizados para o controle dessas plantas, o químico ocupa posição de destaque. A aplicação repetida de herbicidas com mesmo mecanismo de ação seleciona populações resistentes. Este trabalho teve por objetivo avaliar a resistência ao glyphosate em plantas de azevém e relacionar seus mecanismos de resistência com o desenvolvimento de plantas na ausência e na presença do glyphosate. Para isso, realizaram-se estudos de resistência, como curvas de dose-resposta entre genótipos e quantificação de compostos derivados da via do ácido chiquímico. Por fim, plantas resistentes e suscetíveis foram analisadas antes e após a aplicação do glyphosate por uma abordagem proteômica. Confirmou-se a resistência de plantas de azevém ao herbicida glyphosate, com fator de resistência acima de sete vezes entre genótipos. Dentre os mecanismos possíveis para tal, sugerem-se a presença de mutações na enzima EPSPS, a translocação diferencial do herbicida e a superexpressão da EPSPS. Não foram encontrados vestígios da metabolização do glyphosate. Plantas suscetíveis apresentaram maior crescimento que as resistentes na ausência do herbicida bem como maior expressão de grupos proteicos ligados à fotossíntese e a tolerância de indivíduos a estresses, bióticos e abióticos. Com a aplicação do glyphosate, plantas resistentes mantiveram seu metabolismo e passaram a expressar a enzima EPSPS sintase.

**Palavras-Chave:** Ácido chiquímico, aminoácidos aromáticos, mecanismos de resistência ao glyphosate, proteína heatshock, tolerância a estresses

## **CHAPTER 2 – Italian ryegrass glyphosate resistance causes and consequences**

**ABSTRACT** - Weed interference reduces crop yield potential. Among the methods used to control these plants, the chemical occupies major position. Repeated application of herbicides with the same mechanism of action selects resistant populations. The objective of this work was to evaluate the glyphosate resistance in Italian ryegrass plants and to relate their mechanisms of resistance with the development of plants in the absence and presence of the herbicide. Resistance studies were performed, as dose-response curves between genotypes and analysis of compounds derived from the shikimic acid pathway. Finally, resistant and susceptible plants were analyzed before and after application of glyphosate by a proteomic approach. We found resistance of Italian ryegrass plants to glyphosate, with a differential tolerance for glyphosate of up to seven times between genotypes. Among the possible mechanisms for resistance, we suggested the presence of mutations in the EPSPS enzyme, differential translocation of the herbicide and overexpression of EPSPS. No traces of glyphosate metabolism were found. Susceptible plants presented higher growth than those resistant in the absence of the herbicide as well as greater expression of protein groups linked to photosynthesis and the tolerance of individuals to biotic and abiotic stresses. With glyphosate application resistant plants maintained their metabolism and started to express the enzyme EPSPS synthase.

**Keywords:** Shikimic acid, aromatic amino acids, glyphosate resistance mechanism, heat shock protein, stress tolerance.

## INTRODUÇÃO

Plantas daninhas são organismos vegetais que infestam áreas agrícolas e interferem negativamente nas atividades do homem. Devido à interferência, estas tem sido alvo de controle, quase que exclusivamente pelo uso de herbicidas (OWEN, 2016). O uso exclusivo de herbicidas, principalmente aqueles com o mesmo mecanismo de ação, seleciona populações resistentes. Um exemplo é a aplicação repetida e exclusiva do herbicida glyphosate, que na última década vem selecionando diversas espécies de plantas daninhas, aumentando os casos de resistência (HEAP, 2017; DÉLYE; JASIENIUK; LE CORRE, 2013).

Os mecanismos de resistência de plantas daninhas podem ser divididos em resistência do tipo-alvo (target-site resistance, TSR) e resistência do tipo-não alvo (non-target site resistance, NTSR). Os mecanismos TSR ocorrem devido a mutações/deleções ou superexpressão da enzima-alvo onde atuará o herbicida, enquanto os mecanismos NTSR envolvem a minimização e/ou a prevenção do total de herbicida que atinge a enzima-alvo do processo a ser afetado no vegetal (DÉLYE; JASIENIUK; LE CORRE, 2013).

Os azevéns (*Lolium* spp.) são plantas daninhas presentes em diversos países, com populações resistentes a mais de onze mecanismos de ação de herbicidas (HEAP, 2017). São plantas de fisiologia do tipo C3, originadas da região mediterrânea, infestantes de diversos cultivos, principalmente cereais e culturas perenes na região Sul do Brasil. Se não controladas, produzem densas infestações e competem com as culturas por fatores ambientais, como água, luz e nutrientes, podendo reduzir a produtividade de culturas (GALON et al., 2016).

Plantas de azevém apresentam resistência ao glyphosate causada por TSR, NTSR e pela somatória desses. Para TSR, apresentam mutações de aminoácidos na posição Pro-106 da EPSPS bem como sua superexpressão (SALAS et al., 2012; PEREZ-JONES et al., 2007). Para NTSR, apresentam exclusão do herbicida do sítio de ação por interferências na absorção/translocação, sequestro para o vacúolo ou detoxificação do glyphosate, sendo que até o momento não existem relatos da metabolização do produto (GAINES et al., 2014; GHANIZADEH et al., 2016).

Os mecanismos de resistência ao glyphosate em plantas de azevém estão elucidados, mas os processos bioquímicos envolvidos ainda não, principalmente aqueles ligados a NTSR, pois se desconhecem esses genes, que, na maioria das vezes, possuem complexa herdabilidade (HAN et al., 2016). Ainda, plantas de azevém resistentes ao glyphosate parecem apresentar prejuízos no seu desenvolvimento frente às plantas suscetíveis (FERREIRA et al., 2008), mas a causa destas diferenças ainda não foi estudada. Uma maneira de avaliar essas diferenças e estudar possíveis processos afetados pela resistência dessas plantas é por meio da identificação de proteínas expressas nos indivíduos, uma vez que estas permitem a caracterização de diferentes processos que ocorrem nas células, nos tecidos e nos órgãos da planta (KORMUTAKT al., 2006). Em virtude do relatado, objetivou-se avaliar possíveis mecanismos de resistência presentes em plantas de azevém resistentes ao glyphosate, relacionando-os ao desenvolvimento vegetal pela análise de grupos proteicos diferencialmente expressos em indivíduos, antes e após a aplicação do herbicida.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Material vegetal e condições de crescimento*

Sementes de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) foram coletadas no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. As coletas foram realizadas em dois locais: sem e com aplicação frequente do herbicida glyphosate, correspondendo aos municípios de Ijuí (28°23'18,72"S; 53°55'13,75"O) e Três de Maio (27°47'02,77"S; 54°14'05,06"O), respectivamente. Os experimentos foram então conduzidos na Universidade Estadual Paulista – UNESP, nos Campus de Jaboticabal e Botucatu. Essas sementes foram colocadas para germinar em bandejas de poliestireno preenchidas com substrato hortícola (Hortimix®, Agristar, Rio de Janeiro, Brasil). Uma vez emergidas, as plantas apresentando duas a três folhas expandidas foram transplantadas para vasos de 500 mL preenchidos com o mesmo substrato. As bandejas e os vasos foram mantidos sob condições controladas de crescimento, com temperaturas de 26/19°C dia/noite, em fotoperíodo de 12 horas, com 40% de

umidade relativa e incidência de luz de  $240 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Os vasos foram irrigados diariamente e aplicou-se uma solução de ureia diluída em água a 5% v/v, quatorze dias após o transplante.

### *Confirmação da resistência ao glyphosate*

A fim de se confirmar a resistência e a suscetibilidade dos genótipos ao glyphosate, ambos foram submetidos à aplicação do herbicida em um experimento dose-resposta. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 12 repetições por tratamento (com exceção da dose comercial do herbicida [ $720 \text{ g e.a. ha}^{-1}$ ] que foi aplicada em 36 repetições). Após 28 dias do transplante, as plantas que apresentavam de três a quatro perfilhos foram submetidas à aplicação de glyphosate (Roundup Original®,  $360 \text{ g ea L}^{-1}$ ; Monsanto, São José dos Campos, Brasil), com o uso de pulverizador costal pressurizado por  $\text{CO}_2$  e equipado com quatro pontas de pulverização do tipo jato plano em leque (8002; Jacto®, Brasil), regulado para distribuir  $200 \text{ L ha}^{-1}$  de calda em pressão constante de 200 kPa.

O glyphosate foi aplicado nas doses de 0, 180, 360, 720, 1.440 e 2.880 g e.a.  $\text{ha}^{-1}$  em ambiente protegido, com umidade relativa de 84% e temperatura de  $21,4^\circ\text{C}$ . Após a aplicação, as plantas foram colocadas de volta para as condições controladas de crescimento. Vinte e um dias após o tratamento (DAT), o controle visual destas plantas foi avaliado entre 0 e 100%, em que 0% representou ausência de controle e 100% a morte da planta (SBCPD, 1995). Posteriormente, a parte aérea remanescente das plantas foi cortada rente ao solo e submetida à secagem em estufa de circulação forçada de ar ( $60^\circ\text{C}$ ), por 72 horas, para a obtenção da massa da matéria seca. Calculou-se a porcentagem de redução de massa das plantas dos tratamentos em relação à testemunha. Para cada população, o controle estimado e a porcentagem de redução da massa da matéria seca, aos 21 DAT, foram submetidos à análise de regressão não linear log-logística (equação 1), após as médias dos tratamentos apresentarem diferenças estatísticas significativas na análise de variância ( $p \leq 0,05$ ). Para as análises estatísticas, utilizou-se o programa Assistat, e para as regressões, o programa Origin9.

$$[\text{Eq. 1}] Y = a/(1 + \exp(-k(x-x_c)))$$

Em que:  $Y$  representa o controle visual ou a porcentagem de massa da matéria seca em relação à testemunha;  $a$  corresponde ao valor máximo atingido;  $k$  é a curvatura da linha, e  $x_c$  a dose do herbicida utilizada para controle de 50% da população.

A dose do herbicida necessária para causar 50% do controle ( $I_{50}$ ) e 50% redução da massa da matéria seca ( $GR_{50}$ ) foram determinadas utilizando-se da equação 1. O fator de resistência (FR) foi calculado pela equação 2.

$$[\text{Eq. 2}] FR = I_{50R}/I_{50S} \text{ ou } Gr_{50R}/Gr_{50S}$$

Em que:  $R$  representa a população resistente, neste caso originada de Três de Maio, e  $S$ , a mais suscetível, coletada em Ijuí. Por fim, calculou-se a porcentagem de plantas resistentes e suscetíveis para as populações, na dose comercial recomendada do herbicida, nas 36 repetições ( $720 \text{ g e. a. ha}^{-1}$ ).

#### *Mecanismo de resistência ao glyphosate*

Nos biótipos suscetíveis e resistentes, foram determinadas as concentrações do glyphosate, seu principal metabólito (AMPA) e compostos importantes, relacionados à rota metabólica, alvo deste herbicida. No tratamento em que foi aplicada a dose comercial de glyphosate, que correspondeu a  $720 \text{ g e.a. ha}^{-1}$ , foram coletadas as segundas folhas totalmente expandidas de cada planta, antes e depois da aplicação do herbicida (designados a partir de agora como 0 e 72 horas após a aplicação). Estas folhas foram identificadas individualmente e armazenadas em freezer a  $-30^\circ\text{C}$ . Aos 21 DAT, as plantas foram avaliadas quanto à sensibilidade ao herbicida. Foram selecionadas as plantas resistentes e suscetíveis dentro de cada população para posterior análise.

Foram feitas amostras compostas destes indivíduos para a formação de três repetições por população, que foram determinadas as concentrações de ácido

chiquímico, ácido quínico, glyphosate, AMPA, fenilalanina, tirosina e triptofano, no Laboratório de Matologia/NUPAM, da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA, de Botucatu - SP.

As amostras selecionadas foram maceradas com um pistilo de porcelana em almofariz com nitrogênio líquido. Posteriormente, foram armazenadas em tubos de centrifuga, seguido de liofilização em um sistema de liofilização (Christ, alpha 2-4 LD Plus), em temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , por 72 horas. Para cada repetição, utilizaram-se três replicatas.

Em seguida, foi realizada a extração dos compostos, com a adição de 10 mL de água acidificada com ácido acético até pH 3,5, seguida de banho ultrassônico com uma frequência de 42 kHz, por 30 minutos, e centrifugação a 4.000 g, por 10 minutos, a  $20^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro Millex HV de 0,45  $\mu\text{m}$  com membrana Durapore de 13 mm e armazenado em frasco âmbar para subsequente quantificação. A concentração de cada composto nas amostras, foi expressa em gramas de tecido seco (Gomes et al., 2015).

Para a quantificação destes compostos, foi utilizado um sistema LC-MS/MS, com um cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) (Shimadzu, Proeminence UFLC), equipado com duas bombas (LC-20AD), um autoinjeter (SIL-20AC), um criador de vácuo (DGU-20A5), um sistema de controle (CBM-20A) e um forno (CTO-20AC) acoplado a um espectrômetro de massas (3200 Q TRAP) (AppliedBiosystems), com quadrupolo triplo híbrido.

Para a determinação dos compostos e das curvas de calibração, foram utilizados padrões analíticos com pureza superior a 99% (Sigma Aldrich). A otimização das condições do espectrômetro de massas foi realizada com a injeção direta no equipamento (infusões), com uma solução analítica padrão de  $1\text{ mg L}^{-1}$  de cada composto individual. A ionização dos compostos foi realizada por eletrospray (ESI). As condições de calibração de voltagem e da energia de colisão foram determinadas individualmente para as análises de todos os compostos.

Para a realização das análises, adotaram-se os procedimentos descritos por Gomes et al. (2015). Para cada composto, o modo de ionização utilizado foi aquele que permitiu a maior intensidade de sinal. A ionização negativa foi usada para a determinação dos compostos: glyphosate, AMPA, ácido chiquímico e ácido quínico.

Para os aminoácidos Fenilalanina, Tirosina e Triptofano, foi utilizada a ionização positiva. Os compostos ionizados negativamente foram separados por cromatografia, usando uma coluna gemini de 5  $\mu$  C18 110 Å (150 mm x 4,6 mm), sendo a fase móvel composta de 5 mM de acetato de amônia em água (fase A) e 5 mM de acetato de amônia em metanol (fase B), cada uma ajustada para o pH de 7,0. O gradiente utilizado foi: 0 minuto 30% fase B; 2,5 minutos 50% fase B; 5 minutos 75% fase B; 8,5 minutos 90% fase B e 15 minutos 30% fase B, com fluxo de 0,500 mL min<sup>-1</sup>. Para os aminoácidos aromáticos, foi utilizada uma coluna Synergi 2,5  $\mu$  Fusion RP 100Å e a mesma fase móvel descrita anteriormente. O gradiente utilizado foi: 0 minuto 10% fase B; 2 minutos 40% fase B; 4 minutos 95% fase B e 12 minutos 10% fase B, com fluxo de 0,250 mL min<sup>-1</sup>.

O tempo total de corrida utilizado foi de 18 minutos para os compostos ionizados negativamente e de 15 minutos para os aminoácidos ionizados positivamente. O tempo de retenção em minutos, para cada composto na coluna cromatográfica, foi de 3,86 para glyphosate e o ácido chiquímico, de 3,69 para AMPA, 3,79 para ácido quínico, 9,71 para fenilalanina, 6,84 para tirosina e 10,31 para triptofano. Para cada composto, a curva de calibração foi determinada com concentrações de padrões cobrindo a gama de níveis de compostos encontrados em tecidos de plantas (GOMES et al., 2015). Sendo assim, utilizou-se delineamento inteiramente casualizados, em esquema fatorial 2x2 para cada composto, em que o primeiro fator foram os períodos de coleta de folhas e o segundo fator a ausência e a presença do glyphosate. Os dados observados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias, comparadas utilizando-se do teste de Tukey ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Para análise, utilizou-se o programa estatístico Agroestat®.

#### *Abordagem proteômica*

As plantas selecionadas nas avaliações de compostos da rota do ácido chiquímico também foram utilizadas para as análises de proteômica. A coleta foi realizada após 72 horas da aplicação do herbicida, sendo coletadas as segundas folhas da população resistente e suscetível de plantas não tratadas, que foram

colocadas em nitrogênio líquido e imediatamente armazenadas a  $-30^{\circ}\text{C}$  até o processamento.

A extração das proteínas foliares foi realizada através da pulverização do material vegetal em nitrogênio líquido. Alíquotas de 0,5 g foram transferidas para tubos e foram adicionados 4 mL de solução de extração (6M Ureia em  $\text{H}_2\text{O}$ , a 0,1% DTT). Esses foram agitados durante 15 minutos no frio e centrifugados a 3.200 g por 15 minutos, e o sobrenadante foi recolhido e transferido para um tubo novo. Esse processo foi repetido por duas vezes. Foram adicionados, aos sobrenadantes recolhidos, quatro vezes o volume de acetona gelada, e a precipitação das proteínas ocorreu após 12 horas (over-night) a  $-20^{\circ}\text{C}$ , com posterior centrifugação a 3.200 g, e os pellets obtidos foram lavados duas vezes com 200  $\mu\text{L}$  de acetona gelada e secos em fluxo laminar por 5 minutos. As proteínas foram ressuspensas em 100  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra (6M de ureia em 25 mM Ambic). A concentração do extrato proteico foi determinada através do método de Bradford (1976) usando como curva- - padrão concentrações conhecidas de albumina sérica bovina.

Foram utilizadas, para todas as amostras, alíquotas de 20  $\mu\text{g}$  para digestão em solução de proteínas, que foi realizada durante 12 h a  $37^{\circ}\text{C}$ , com adição de tripsina, na proporção 1:50 (enzima: proteína). Posteriormente, as amostras foram secas a vácuo, dessalinizadas com o uso de colunas de C18 do tipo “spin columns” (Thermo Fisher Scientific), conforme recomendações do fabricante, e ressuspensas a 0,1% de ácido fórmico no momento das análises de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas.

Os peptídeos foram separados através de uma coluna de C18 (15 cm, 3  $\mu\text{m}$ , 120Å) por cromatografia líquida de fase reversa, com um gradiente de cento e vinte minutos a 5% a 70% de 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila, em um fluxo de 500 nL/min. A análise em espectrômetro de massas foi realizada utilizando o Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific), operado no modo de íons positivos, no modo dependente de dados (DDA), com ciclos constituídos de um “fullscan” a 70.000 FWHM (400-2000m/z), seguido de dez ciclos “data dependente scans” a 35.000 FWHM. A fragmentação peptídica foi obtida pela fragmentação HCD, utilizando-se de colisão com energia de 27eV. Íons isoladamente carregados foram excluídos, e íons peptídicos selecionados para fragmentação foram excluídos por trinta segundos.

A identificação de proteínas foi realizada pelo método de contagem espectral, e as sequências proteicas de milho (*Zea mays*), adquiridas do site Phytozome (GOODSTEIN et al., 2012). As identificações foram realizadas com o uso da plataforma integrada PatternLab for Proteomics (CARVALHO et al., 2016). Para a correlação espectral, foi utilizada a ferramenta Comet (ENG; JAHAN; HOOPMANN, 2013), disponível na plataforma, com as seguintes modificações: carbamidometilação de cisteína e oxidação de metionina, como modificação estática e variável, respectivamente. Todos os alinhamentos dos espectros foram filtrados com o SePro (CARVALHO et al., 2012) e ajustados para 1% de falsos-positivos (FDR). Proteínas que compartilharam peptídeos comuns foram agrupadas de acordo com o princípio da máxima parcimônia, e a expressão relativa das proteínas, avaliada usando a abordagem NSAF (PAOLETTI et al., 2006).

Foram consideradas como proteínas diferencialmente reguladas aquelas que, entre as populações, mostraram diferença de expressão igual ou superior a duas vezes (“foldchange”  $\geq 2$ ). Ainda, foram consideradas como diferencialmente reguladas as proteínas exclusivas, que foram identificadas em apenas uma das populações.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Compostos da via do ácido chiquímico*

As populações testadas apresentaram diferenças de suscetibilidade ao herbicida glyphosate. A população originada de Ijuí mostrou-se sensível ao herbicida (designada a partir de agora como suscetível - S), sendo as plantas controladas com o uso de 360 g ea ha<sup>-1</sup> de glyphosate (controle superior à 80%). A população originada de Três de Maio, por outro lado, não foi controlada mesmo com o uso de 2.440 g ea ha<sup>-1</sup> de glyphosate, sendo designada a partir de agora como resistente (R) (Figura 1). Com relação à pureza destas populações quanto à resistência, nas 36 repetições aplicadas em dose comercial, 92% das plantas morreram e sobreviveram nas populações suscetível e resistente, respectivamente.

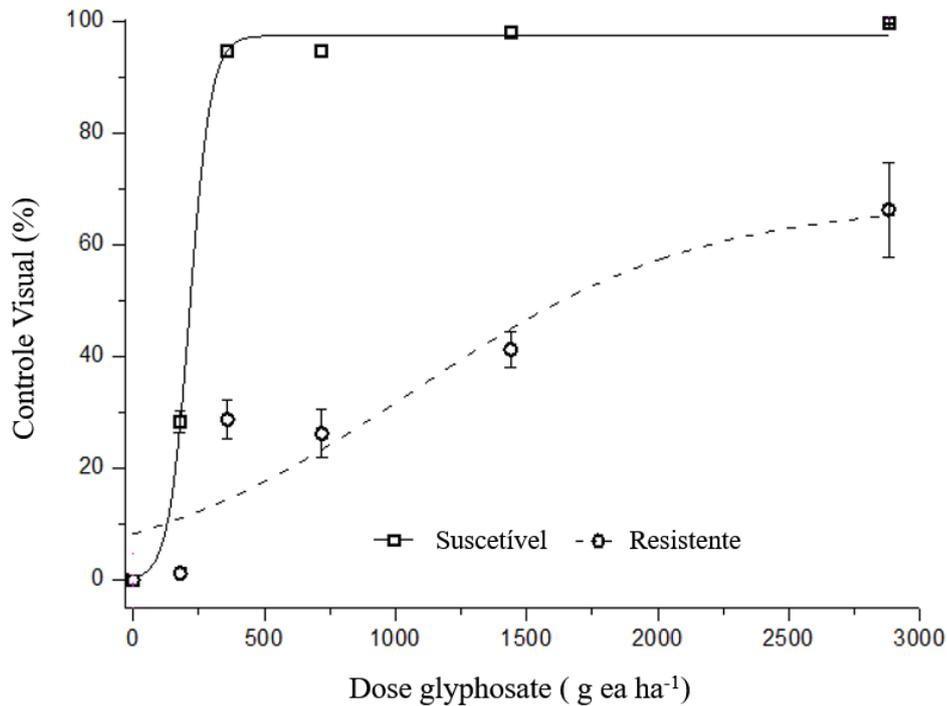


Figura 1. Porcentagem de controle visual (%) das populações R (Três de Maio) e S (Ijuí) de azevém, aos 21 dias após a aplicação de doses crescentes de glyphosate. Equações; R:  $Y=67,41/(1+\exp(-0,0018(x-1.062,42)))$ ,  $R^2=0,99$ ; S:  $Y=88,17/(1+\exp(-0,021(x-339,74)))$ ,  $R^2=0,79$ .

Pelos valores de  $I_{50}$  e  $GR_{50}$  obtidos, nota-se elevado grau de resistência ao herbicida glyphosate na população de Três de Maio. O valor de  $I_{50}$  da população S foi de 218 g e.a. ha<sup>-1</sup> enquanto o da R foi de 1.635 g e.a. ha<sup>-1</sup>. Para o  $GR_{50}$ , estes valores foram de 355,3 g e.a. ha<sup>-1</sup> para o genótipo S e não atingido para o resistente. Sendo assim, chegou-se ao fator de resistência (FR) de 7,49, comprando-se o  $I_{50}$  das populações, e no mínimo 8,1, comparando-se o  $GR_{50}$ . Esses valores estão de acordo com valores relatados para a resistência ao glyphosate em populações de azevém, porém abaixo de alguns relatos com FR mais elevados, com níveis superiores a vinte. Nesses casos, foram detectados mecanismos de resistência relacionados com a superexpressão e mutações na EPSPS (GHANIZADEH et al., 2016; GHANIZADEH et al., 2014; SALAS et al., 2012; PEREZ-JONES et al., 2007).

Na análise dos compostos derivados da rota do ácido chiquímico, observou-se que as plantas de azevém apresentaram diferenças nos teores de aminoácidos aromáticos, sendo que a aplicação de glyphosate alterou o metabolismo desses de

maneira específica para cada um. A fenilalanina esteve presente em concentrações similares em ambos os genótipos, com ou sem a aplicação do herbicida. A tirosina foi detectada em maiores quantidades no genótipo suscetível e foi reduzida com a aplicação do glyphosate em ambos os genótipos. O triptofano foi encontrado também em maiores quantidades no genótipo suscetível. A aplicação, nesse caso, não acarretou a diminuição da concentração desse aminoácido (Tabela 1).

Tabela 1. Quantidade de aminoácidos essenciais (Fenilalanina, Tirosina e Triptofano) em mg por g de massa de plantas de azevém, a zero e a setenta e duas horas após a aplicação de 720 g ea ha<sup>-1</sup> de glyphosate, em plantas de azevém.

Aminoácidos	Genótipos		
	Fenilalanina	Tirosina (mg g <sup>-1</sup> )	Triptofano
Resistente	50,06 a	21,06 b	32,77 b
Suscetível	53,86 a	33,58 a	50,96 a
Horas			
0	53,75 a	30,01 a	41,63 a
72	50,18 a	24,36 b	42,10 a
Fg <sup>1</sup>	4,61 NS	39,65 **	34,01 *
Fh <sup>2</sup>	4,07 NS	5,48 *	0,02 NS
Fg <sub>x</sub> h <sup>3</sup>	0,60 NS	0,08 NS	1,28 NS
CV (%) <sup>4</sup>	5,89	14,57	12,90

<sup>1</sup>Valores de F para genótipo, <sup>2</sup>Horas e <sup>3</sup>Interação genótipo<sub>x</sub>horas. <sup>4</sup>Coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, em nível de probabilidade de erro de 5%. \*,\*\* Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente. NS Não significativo.

Sabe-se que a aplicação do glyphosate em plantas suscetíveis inibe a enzima EPSPS, o que gera bloqueio da rota do ácido chiquímico, responsável pela produção desses aminoácidos. A aplicação do glyphosate deveria, portanto, reduzir as concentrações dos aminoácidos em longo prazo, como ocorrido para a tirosina nesse caso. Os aminoácidos fenilalanina e triptofano deveriam apresentar igual resposta à aplicação do herbicida, por possuírem o mesmo precursor na via do ácido chiquímico, o prefenato; porém, para isso, avaliações posteriores deveriam ter sido realizadas (CARBONARI et al., 2014). A não alteração dos níveis de triptofano nesse caso está ligada ao fato de esse aminoácido ser o menos sensível à inibição causada pelo glyphosate (AMRHEIN et al., 1980). Segundo Wang (2001), os níveis de aminoácidos aromáticos em *Nicotiana plumbaginifolia* caíram após quatro dias da

aplicação de glyphosate, em níveis de 59%, 77% e 13%, respectivamente, para tirosina, fenilalanina e triptofano.

A menor concentração dos aminoácidos tirosina e triptofano, em plantas resistentes, anterior à aplicação do herbicida, pode estar, nesse caso, ligada à presença de um mecanismo-alvo de resistência ao glyphosate. Tem-se, por exemplo, decorrente das mutações da EPSPS, muitas vezes, uma alteração também no metabolismo desses, decorrente do fato de que a mutação pode alterar não apenas a afinidade da enzima com o herbicida, mas também com seu substrato, nesse caso o fosfoenolpiruvato (PEP) (FUNKE et al., 2006). Em geral, alterações na Pro-106 do gene EPSPS geram baixos valores de resistência nas plantas afetadas, variando seu FR entre 2 e 3, abaixo dos níveis aqui encontrados, o que sugere a combinação entre mecanismos de resistência-alvo e não alvo nessa população (SAMMONS; GAINES, 2014).

Com relação aos compostos derivados da rota do ácido chiquímico, observou-se interações dos valores de glyphosate, ácido chiquímico e ácido quínico entre as populações e a aplicação de glyphosate. Não foram observadas diferenças quanto aos valores de AMPA nos genótipos, mas apenas um leve acréscimo de seu conteúdo após a aplicação de glyphosate (Tabela 2). A não alteração diferencial do conteúdo de AMPA exclui a metabolização do glyphosate como mecanismo de resistência nas plantas de *L. multiflorum*. O ácido aminometilfosfônico (AMPA) é um subproduto da degradação do herbicida glyphosate em algumas espécies devido a ação da enzima glyphosate oxidoreductase (GOX), porém esse mecanismo nunca foi relatado em plantas de azevém (NANDULA et al., 2007).

O conteúdo de glyphosate em plantas de *L. multiflorum* sem a aplicação dos herbicidas foi zero, pois o mesmo é um produto exógeno ao metabolismo vegetal. Após 72 horas de aplicadas, as folhas de plantas resistentes apresentavam maiores quantidades do herbicida (Tabela 3).

Tabela 2. Quantidade de compostos da rota do ácido chiquímico (glyphosate, ácido chiquímico, ácido quínico e AMPA) em mg por g de massa de plantas de azevém, a zero e setenta e duas horas após a aplicação de 720 g ea ha<sup>-1</sup> de glyphosate, em plantas de azevém.

Compostos	Glyphosate	Ácido chiquímico	Ácido quínico	AMPA
	(mg g <sup>-1</sup> )			
Genótipos				
Resistente	26,15	18,88	47,20	0,08 a
Suscetível	21,08	134,25	126,30	0,06 a
Horas				
0	0,00	6,13	33,16	0,00 b
72	47,23	147,00	140,33	0,15 a
Fg <sup>1</sup>	19,05 **	36,92 **	17,69 **	0,50 NS
Fh <sup>2</sup>	1655,31 **	55,05 **	32,48 **	40,50 **
Fgxh <sup>3</sup>	19,05 **	40,37 **	17,60 **	0,50 NS
CV (%) <sup>4</sup>	8,51	49,25	37,54	54,43

<sup>1</sup>Valores de F para genótipo. <sup>2</sup>Horas e <sup>3</sup>Interação genótipo×horas. <sup>4</sup>Coefficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, em nível de probabilidade de erro de 5%. \*, \*\* Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente. NS Não significativo.

Tabela 3. Desdobramento do efeito do genótipo e das horas de aplicação sobre a concentração de glyphosate (g mg<sup>-1</sup>) em plantas de azevém.

Genótipo/horas	0	72
Resistente	0,00 aB	52,30 aA
Suscetível	0,00 aB	42,16 bA

Letras minúsculas comparam genótipos dentro das horas. Maiúsculas comparam as horas dentro dos genótipos.

Esse fato corrobora os observados por Lorraine-Colwill et al. (2002), nos quais plantas resistentes de azevém apresentaram maior retenção do herbicida na superfície foliar, em períodos superiores a 64 horas após a aplicação. Ainda, segundo os autores, esse fato está ligado à menor translocação do herbicida no genótipo resistente. Esse resultado corrobora a teoria da presença de múltiplos mecanismos de resistência no azevém aqui estudado, exatamente como descrito em outras populações (PEREZ-JONES et al., 2007). Essa espécie é muito suscetível a esse tipo de combinação, já que possui polinização cruzada (SAMMONS; GAINES, 2014).

Com relação ao conteúdo de ácido chiquímico, antes da aplicação do herbicida, os valores entre genótipos foram semelhantes. Após a aplicação do glyphosate, plantas suscetíveis acumularam o ácido chiquímico em níveis superiores a nove vezes, se comparadas as plantas resistentes (Tabela 4). O acúmulo do ácido chiquímico representa um resultado direto da inibição da EPSPS. Diversos são os relatos do acúmulo de ácido chiquímico com a aplicação do glyphosate em indivíduos sensíveis ao herbicida (REDDY et al., 2008).

Tabela 4. Desdobramento do efeito do genótipo e das horas de aplicação sobre a concentração de ácido chiquímico ( $\text{g mg}^{-1}$ ) em plantas de azevém.

Genótipo/horas	0	72
Resistente	8,76 aA	29,00 bA
Suscetível	3,50 aB	265,00 aA

Letras minúsculas comparam genótipos dentro das horas. Maiúsculas comparam as horas dentro dos genótipos.

O comportamento do ácido quínico foi semelhante ao observado para o ácido chiquímico, sendo acumulado apenas no genótipo suscetível após a aplicação do herbicida (Tabela 5).

Tabela 5. Desdobramento do efeito do genótipo e das horas de aplicação sobre a concentração de ácido quínico ( $\text{g mg}^{-1}$ ) em plantas de azevém.

Genótipo/horas	0	72
Resistente	33,06 aA	61,33 bA
Suscetível	33,26 aB	219,33 aA

Letras minúsculas comparam genótipos dentro das horas. Maiúsculas comparam as horas dentro dos genótipos.

Esse acúmulo ocorreu em menor intensidade comparando-se genótipos, pois segundo Carbonari et al. (2014), trata-se de um indicador menos sensível à intoxicação com o herbicida. Outros trabalhos relatam o acúmulo de ácido quínico após a aplicação do glyphosate em plantas sensíveis ao glyphosate, pois o ácido quínico é um composto alternativo à rota do ácido chiquímico (ORCARAY et al., 2010).

A análise da biomassa de plantas sem a aplicação de herbicidas reforçou a vantagem de desenvolvimento do genótipo suscetível frente ao resistente. Durante a condução dos ensaios de curva de dose-resposta, as plantas suscetíveis

apresentaram o acúmulo de massa seca 38% superior ao das plantas tolerantes, demonstrando, nesse caso, haver uma penalidade no desenvolvimento de plantas resistentes. Esse prejuízo de desenvolvimento fica mais claro quando são analisados os grupos proteicos expressos em ambos genótipos, sem a aplicação do glyphosate.

#### *Expressão de grupos proteicos.*

Considerando-se os grupos expressos em ambos os genótipos, apenas um resultou mais expresso (superior em duas vezes) em plantas suscetíveis, sendo esse o grupo 4Fe-4S diclusterdomain (Figura 2).

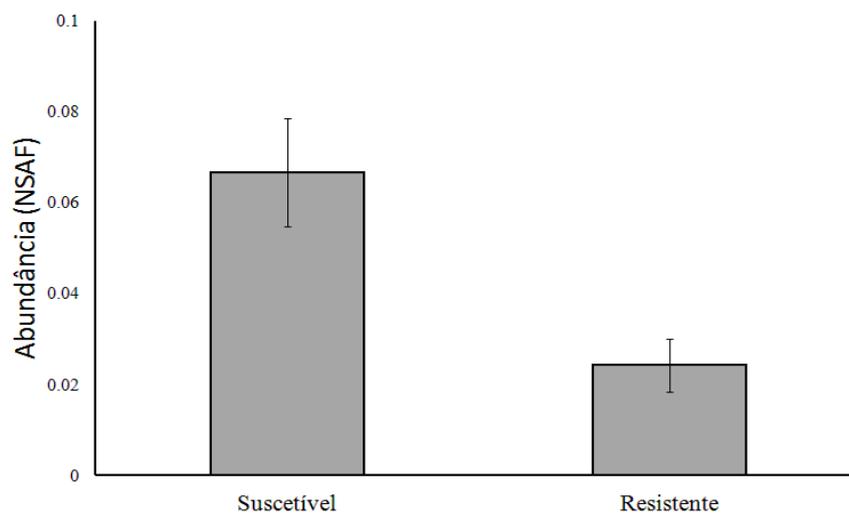


Figura 2. Expressão do grupo proteico 4Fe-4S diclusterdomain, apresentando diferença em plantas suscetíveis e resistentes de azevém sem o glyphosate. Valores representam a média de três repetições  $\pm$  erro-padrão.

Nenhum grupo se apresentou mais expresso em plantas resistentes do que em suscetíveis. A maior expressão desse grupo pode estar ligada a diversos processos metabólicos nas plantas, tais como fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio e reparo do DNA. Esse grupo está localizado no centro de reação do fotossistema I, sendo, portanto, relacionado diretamente com o fluxo de elétrons e

com geração de energia. Ainda, na literatura, existem relatos de que atuam como sinalizadores ao estresse oxidativo (RAO; OLDFIELD, 2016).

Outros grupos também foram expressos apenas em plantas suscetíveis ao herbicida, sem a aplicação do glyphosate. A maioria, nesse caso, está ligada à defesa do organismo vegetal contra estresses bióticos e abióticos, aparentando que a planta resistente teria um *trade-off* dessa proteção com sua proteção ao glyphosate (Figura 3).

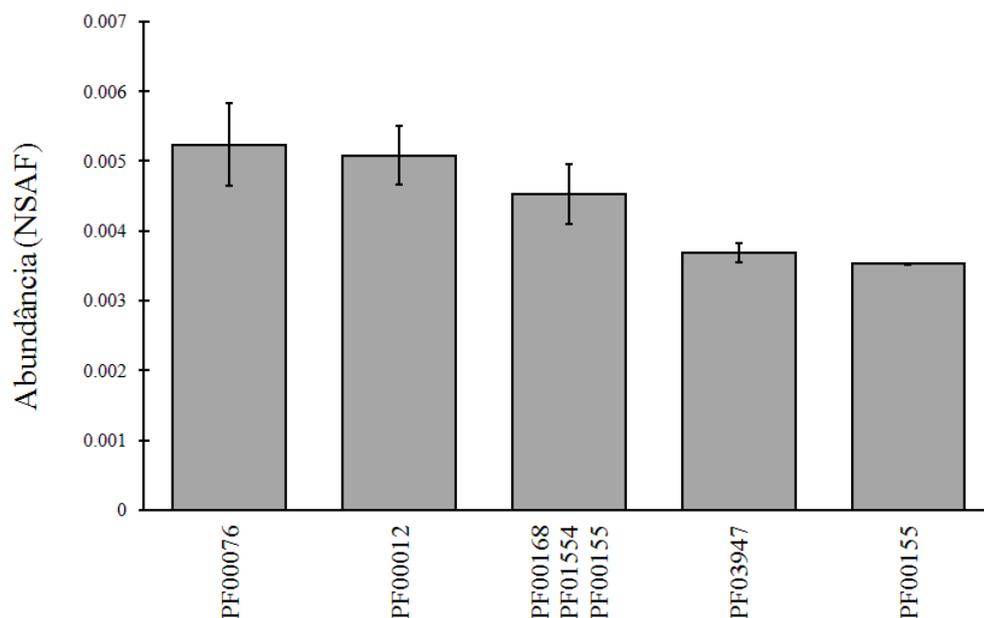


Figura 3. Expressão dos grupos proteicos PF00076 (Splicing factor 3b), PF00012 (Heatshockprotein), PF00168, PF01554, PF00155 (Multidrugresistance), PF03947 (50S ribosomalprotein) e PF00155 (Gamma-glutamyltransferase) em plantas suscetíveis de azevém sem a presença do glyphosate. Valores representam a média de três repetições  $\pm$  erro-padrão.

Tem-se, por exemplo, a expressão em indivíduos suscetíveis do grupo PF00012 (HeatShockProtein 70KDA) e dos grupos PF00168, PF01554 e PF00155 (MultidrugResistance), proteínas presentes em diversos organismos reguladas para atuar frente a estresse. O grupo PF00012 possui funções de síntese, transporte e degradação proteica (KIANG; TSOKOS, 1998). Nos vegetais, pelo menos 19 genes são responsáveis pela expressão desse grupo. Sua superexpressão, muitas vezes,

está relacionada com tolerância térmica, salina e a déficits hídricos (WANG et al., 2004).

Outros grupos expressos também se relacionam à resistência a drogas (PF00168, PF01554, PF00155), sendo responsáveis pela sobrevivência de células frente a estresses. Como exemplo, são responsáveis pela extrusão de xenobióticos e metabólicos tóxicos de células. A tolerância ao herbicida glyphosate e a expressão dessas proteínas em plantas nunca foram confirmadas, o que corrobora sua expressão em plantas sensíveis, nesse caso. Porém, existem evidências de tolerância a esse herbicida causada pela expressão desse grupo de proteínas em bactérias (STAUB et al., 2012). As outras proteínas expressas estão relacionadas com movimentação de proteínas e edição do código genético (PF00076, Splicing fator 3b e 5PF039470S, Ribosomalprotein) e relacionadas à transferência de aminoácidos pelas membranas (PF00155, Gamma-glutamyltransferase).

Assim, dentro dessas expressões, chega-se a duas hipóteses: ou as plantas resistentes perderam a capacidade de expressar esse conjunto de proteínas e com isso se tornaram menos adaptadas frente a estresses, como os causados pela competição por elementos do meio, como demonstrado em outros trabalhos (FERREIRA et al., 2008), ou as plantas resistentes não necessitam dessa expressão a todo momento, acionando apenas esses mecanismos de defesa quando em competição. O mecanismo de resistência, nesse caso como outros, tais como a superexpressão enzimática, estaria adaptado a ser produzido apenas com a aplicação do herbicida glyphosate e não ocasionaria perdas na competitividade do azevém, como também já relatado na literatura (VILA-AIUB et al., 2014).

Após a aplicação do glyphosate, nenhum grupo proteico esteve expresso em plantas suscetíveis que não em resistentes. Alguns grupos estiveram igualmente presentes em ambos os genótipos, sendo processos ligados ao metabolismo de carboidratos como a frutose e processos relacionados à fixação de carbono (expressão da RuBisCO, por exemplo). Já as plantas resistentes expressaram diversos grupos proteicos não ativos em plantas suscetíveis. Os principais processos expressos identificados foram a biossíntese de metabólitos secundários, a biossíntese de fenilpropanoides, o metabolismo de carbono, a biossíntese de aminoácidos e a fixação de carbono (Figura 4).

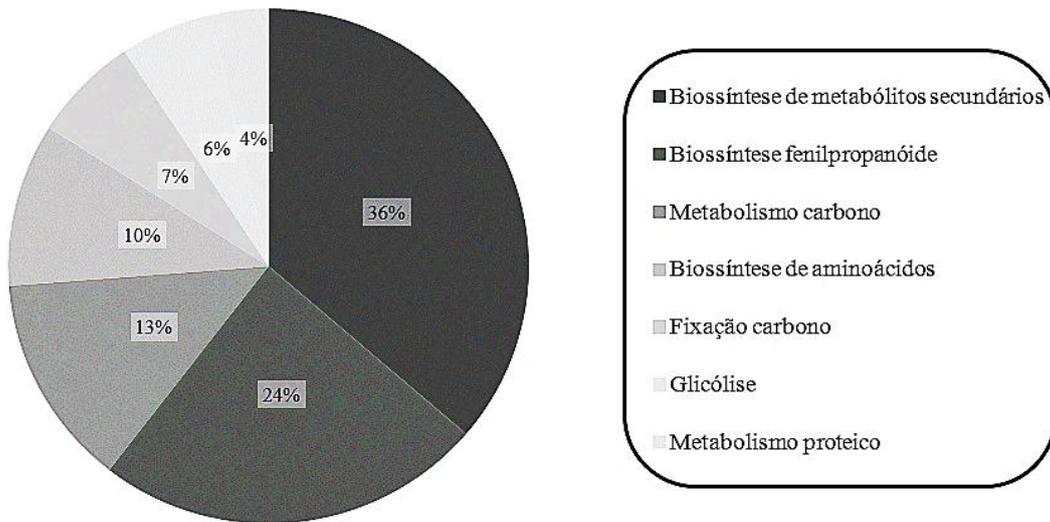


Figura 4. Porcentagem média de grupos proteicos expressos por processo metabólico em plantas de azevém resistentes ao glyphosate, após sua aplicação (72 horas).

Esperava-se encontrar processos ligados à síntese de metabólitos secundários nas plantas sobreviventes à aplicação do glyphosate, pois a via do ácido chiquímico é responsável pela síntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano, que irão gerar esses metabólitos. As plantas de azevém expressaram enzimas, por exemplo, do tipo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, que são enzimas ligadas ao estresse vegetal. A aplicação de herbicidas, bem como a presença de  $H_2O_2$  em plantas, é responsável por diminuir ou por inibir a expressão dessas, o que não ocorreu nas plantas resistentes (AHSAN et al., 2008). Ainda nas plantas resistentes, encontrou-se a expressão de enzimas transketolase, responsáveis por até 40% da atividade fotossintética de plantas. No azevém suscetível, essas não foram expressas. Além disso, esse grupo proteico é importante, também, no metabolismo dos fenilpropanóides. Esse mesmo grupo foi encontrado recentemente em plantas de *Conyza canadensis* resistentes ao glyphosate, por translocação diferencial do herbicida (GONZÁLEZ-TORRALVA; BROWN; CHIVASA, 2017; HENKES et al., 2001).

Sabe-se que a biossíntese de fenilpropanóides é afetada pelo glyphosate. Nas plantas resistentes, foram identificados compostos relacionados a essa via, o que não ocorreu para plantas suscetíveis. A rota bioquímica da biossíntese de

fenilpropanoides está ligada à produção de compostos fenólicos e metabolitos secundários, incluindo a lignina, que são reduzidos pela aplicação do herbicida em plantas sensíveis ou inibidos (MARCHIOSI et al., 2009), como observado neste trabalho.

As plantas resistentes apresentaram, também, compostos ligados ao metabolismo do carbono, sendo proteínas relacionadas ao metabolismo e à geração de energia nos vegetais. Entre elas, está a expressão da enzima malato desidrogenase, enzima essencial no metabolismo do malato. A expressão dessa pode ter ocorrido nas plantas devido ao seu metabolismo normal ou estimuladas pelo uso do glyphosate, pois essa já apresentou expressão estimulada por herbicidas. Outra enzima-chave no processo, que foi expressa, foi a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, uma enzima fundamental na síntese de glicose (AHSAN et al., 2008).

Além dessas enzimas, observou-se, nas plantas resistentes, a continuidade na via de produção dos aminoácidos cisteína, glicina e alanina, processos interrompidos na planta suscetível. Observou-se, também, apenas nas plantas resistentes, a expressão da enzima enolpiruvichiquimato-3-fosfato sintase, responsável pela síntese dos aminoácidos aromáticos da via do ácido chiquímico (triptofano, tirosina e fenilalanina), o que confirma os resultados apresentados anteriormente quanto ao possível mecanismo de resistência presente nas plantas.

Com relação à expressão ligada à tolerância a glyphosate, verificou-se a expressão das proteínas do tipo HeatShock, anteriormente expressas nas plantas suscetíveis, corroborando o fato de que as plantas resistentes podem apresentar uma sinalização a determinados estresses diferentes das plantas suscetíveis. Ainda, esteve expressa a enzima EPSPS sintase, responsável pela síntese de EPSPS nos vegetais. Não se pode afirmar que esses indivíduos apresentaram, portanto, superexpressão enzimática como mecanismo de resistência ao glyphosate, mas existe esse indício, como já relatado para a espécie em outros trabalhos (SALAS et al., 2012). Reforça-se essa teoria pelo fato de que nenhum dos genótipos apresentou a expressão dessa enzima anterior à aplicação do glyphosate.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que a população de *Lolium multiflorum* originada de Três de Maio apresenta resistência ao herbicida glyphosate causada por um conjunto de mecanismos-alvo e não alvos de resistência. Essas plantas apresentaram menor crescimento se comparadas às plantas suscetíveis e menor expressão de proteínas ligadas à defesa da planta contra estresses sem a aplicação do herbicida. Após a aplicação de glyphosate, as plantas resistentes expressaram proteínas ligadas ao metabolismo energético e síntese de metabólitos secundários além da expressão da enzima EPSPS sintase que pode estar ligada a resistência ao glyphosate.

## REFERÊNCIAS

AHSAN, N.; LEE, D. G.; LEE, K. W.; ALAM, I.; LEE, S. H.; BAHK, J. D.; LEE, B. H. Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 1062-1070, 2008.

AMRHEIN, N.; DEUS, B.; GEHRKE, P.; STEINRUCKEN, H. C. The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. II. Interference of glyphosate with chorismate formation in Vivo and in Vitro. **Plant Physiology**, v. 66, p. 830-834, 1980.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

CARBONARI, C. A.; GOMES, G. L. G. C.; VELINI, E. D.; MACHADO, R. F.; SIMÕES, P. S.; MACEDO, G. C. Glyphosate effects on sugarcane metabolism and growth. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 3585-3593, 2014.

CARVALHO, P.C.; LIMA, D. B.; LEPREVOST, F. V.; SANTOS, M. D.; FISCHER, J. S.; AQUINO, P. F.; MORESCO, J. J.; YATES, JR.; BARBOSA, V. C. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nature Protocols**, v. 11, p. 102-117, 2016.

CARVALHO, P. C.; FISCHER, J. S.; YATES, JR.; BARBOSA, V. C. PatternLab: from mass spectra to label-free differential shotgun proteomics. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 13, p. 13-19, 2012.

DÉLYE, C.; JASIENIUK, M.; LE CORRE, V. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. **Trends in Genetics**, v. 29, p. 649–658, 2013.

ENG, J. K.; JAHAN, T. A.; HOOPMANN, M. R. Comet: An open-source MS/MS sequence database search tool. **Proteomics**, v. 13, p. 22–24, 2013.

FERREIRA, E. A.; CONCENÇO, G.; SILVA, A. A.; REIS, M. R.; VARGAS, L.; VIANA, R. G.; GUIMARÃES, A. A.; GALON, L. Potencial competitivo de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*). **Planta Daninha**, v. 26, p. 261-269, 2008.

FUNKE T.; HAN, H.; HEALY-FRIED, M. L.; FISCHER, M.; SCHONBRUNN, E. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 103, p. 13.010-13.015, 2006.

GAINES, T. A.; LORENTZ, L.; FIGGE, A.; HERMANN, J.; MAIWALD, F.; HAN, H.; BUSI, R.; YU, Q.; POWLES, S. B.; BEFFA, R. RNASeq transcriptome analysis to identify genes involved in metabolism-based diclofop resistance in *Lolium rigidum*. **Plant Journal**, v. 78, p. 865–876, 2014.

GALON, L.; FORTE, C. T.; GIACOMINI, J. P.; REICHERT JR, F. W.; SCARIOT, M. A.; DAVID, F. A.; PERIN, G. F. Competitive ability of lettuce with ryegrass. **Planta Daninha**, v. 34, p. 239-247, 2016.

GHANIZADEH, H.; HARRINGTON, K.; TAMES, T.; WOOLEY, D.; ELLISON, N. 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. 18, p. 1.041-1.051, 2016.

GHANIZADEH, H.; HARRINGTON, K. C.; JAMES, T. K.; WOOLEY, D. J.; ELLISON, N. W. Mechanisms of glyphosate resistance in two perennial ryegrass (*Lolium perenne*) populations. **Pest Management Science**, v. 71, p. 1617-1622, 2014.

GOMES, G. L. G. C.; CARBONARI, C. A.; VELINI, E. D.; TRINDADE, M. L. B.; SILVA, J. R. M. Extraction and simultaneous determination of glyphosate, AMPA and

compounds of the shikimic acid pathway in plants. **Planta Daninha**, v. 33, p. 295-304, 2015.

GONZÁLEZ-TORRALVA, F.; BROWN, A. P.; CHIVASA, S. Comparative proteomic analysis of horseweed (*Conyza canadensis*) biotypes identifies candidate proteins for glyphosate resistance. **Scientific Reports: Nature**, 2017.

GOODSTEIN, D.M.; SHU, S.; HOWSON, R.; NEUPANE, R.; HAYES, R. D.; FAZO, J.; MITROS, T.; DIRKS, W.; HELLSTEN, U.; PUTNAM, N.; ROKHSAR, D. S. Phytozome: a comparative platform for green plant genomic. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 1178–1186, 2012.

HAN, H.; YU, Q.; CAWTHRAY, G. R.; POWLES, S. B. Widespread occurrence of both metabolic and target-site herbicide resistance mechanisms in *Lolium rigidum* populations. **Pest Management Science**, v. 72, p. 255–256, 2016.

HEAP. **The international survey of herbicide resistant weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org>>; Acesso em: 25 maio 2017.

HENKES, S.; SONNEWALD, U.; BADUR, R.; FLACHMANN, R.; STITT, M. A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, v. 13, p. 535-551, 2001.

KIANG, J. G.; TSOKOS, G.C. Heat shock protein 70kda: Molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 80, p. 183-201, 1998.

KORMUTAK, A.T.; VOOKOVA, T.S. Storage protein dynamics in zygotic and somatic embryos of white fir. **Biologia, Bratislava**, v. 61, p. 479-486, 2006.

LORRAINE-COLWILL, D. F.; POWLES, S. B.; HAWKES, T. R.; HOLLINSHEAD, P. H.; WARNER, S. A. J.; PRESTON, C. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 74, p.62-72, 2012.

MARCHIOSI, R.; FERRARESE, M. L. L.; BONINI, E. A.; FERNANDES, N. G.; FERRO, A. P.; FERRARESE-FILHO, O. Glyphosate-induced metabolic changes in susceptible and glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.) roots. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 93, p. 28-33, 2009.

NANDULA, V.K.; POSTON, D. H.; EUBANK, T. W.; KOGER, C. H.; REDDY, K. N. Differential response to glyphosate in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) populations from Mississippi. **Weed Technology**, v. 21, p. 477-482, 2007.

ORCARAY, L.; IGAL, M.; MARINO, D.; ZABALZA, A.; ROYUELA, M. The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. **Pest Management Science**, v. 66, p. 262-269, 2010.

OWEN, M. D. K. Diverse approaches to herbicide-resistant weed management. **Weed Science**, Edição especial, p. 570-584, 2016.

PAOLETTI, A.C.; PARMELY, T. J.; TOMOMORI-SATO, C.; SATO, S.; CONAWAY, R. C.; CONAWAY, J. W.; FLORENS, L.; WASHBURN, M. P. Quantitative proteomic analysis of distinct mammalian mediator complexes using normalized spectral abundance factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 103, p. 18.928–18.933, 2006.

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

RAO, G.; OLDFIELD, E. Structure and function of four classes of the 4Fe-4S protein, IspH. **Biochemistry**, v. 55, p. 4.119-4.129, 2016.

REDDY, K. N.; RIMANDO, A. M.; DUKE, S. O.; NANDULA, V. K. Aminomethylphosphonic acid accumulation in plant species treated with glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 2.125-2.130, 2008.

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.

SAMMONS, R. D.; GAINES, T. A. Glyphosate Resistance: State of Knowledge. **Pest Management Science**, v. 70, p. 1367-1377, 2014.

SBCPD. Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. **Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas**. Londrina-PR: SBCPD, 1995. 42p.

STAUB, J. M.; BRAND, L.; TRAN, M.; KONG, Y.; ROGERS, S. G. Bacterial glyphosate resistance conferred by overexpression of an *E. coli* membrane efflux transporter. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 641-647, 2012.

VILA-AIUB, 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. 793-801, 2014.

WANG, W.; VINOCCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 1360-1385, 2004.

WANG, C. Y. Effects of glyphosate on aromatic amino acid metabolism in purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). **Weed Technology**, v. 15, p. 628-635, 2001.

### **CAPÍTULO 3 – Efeitos de mutações na EPSPS na adaptabilidade ecológica e competitiva do capim-pé-de-galinha**

**RESUMO** - A resistência de plantas daninhas a herbicidas pode ser causada por mecanismos relacionados a mutações na enzima-alvo onde atua o herbicida. Entre elas, no capim-pé-de-galinha, existem genótipos com uma única mutação na posição 106, e uma dupla mutação nas posições 102 e 106 do gene EPSPS. A resistência ao herbicida pode provocar alterações no desenvolvimento e na reprodução dessas populações. Com este trabalho, buscou-se identificar e quantificar essas alterações por meio de dois estudos. No primeiro, plantas de capim-pé-de-galinha de diferentes genótipos, com ambas as mutações, foram postas para crescer em conjunto com plantas de soja, na ausência e presença do glyphosate. Avaliaram-se características de adaptabilidade dessas plantas, como sua sobrevivência ao herbicida, biomassa aérea, número de sementes produzidas e fitness relativo. No segundo trabalho, buscou-se conhecer os efeitos de diferentes densidades (30 e 130 plantas m<sup>2</sup>) de cada um desses genótipos na produtividade da soja, com e sem a aplicação do glyphosate. Para isso, avaliaram-se a produtividade final da soja e a biomassa aérea acumulada pelas plantas de capim-pé-de-galinha. Na ausência do herbicida, os genótipos selvagens e com uma única mutação apresentaram comportamento semelhante, enquanto com o herbicida passaram a comportar-se de maneira semelhante os genótipos com uma ou duas mutações. A competição com soja reduziu os benefícios e elevou os custos de resistência, principalmente para o genótipo duplo mutado. A interferência causada pelos genótipos com uma mutação ou selvagem é maior do que a causada pelo genótipo duplo mutado sem o herbicida. A aplicação do glyphosate, mesmo que em plantas resistentes, favoreceu a alta produtividade da soja, seja devido aos efeitos do herbicida, seja pelas mutações presentes no capim-pé-de-galinha.

**Palavras-Chave:** *Eleusine indica*, fitness, *Glycine max*, P106S, TIPS, WT

### **CHAPTER 3– EPSPS mutations effects in goosegrass ecological and competitive fitness.**

**ABSTRACT** - Herbicide resistance in weeds can be caused by mechanisms related to mutations in the target enzyme where the herbicide acts. Among them, there are genotypes with single mutation at position 106 and double mutation at positions 102 and 106 of the EPSPS gene. Resistance to the herbicide can cause changes in the development and reproduction of these populations. Here we aimed to identify and quantify these changes by two studies. In the first, goosegrass genotypes plants of both genotypes with no, single and double mutations (WT, P106S and TIPS respectively) were set to grow together with soybean plants in the absence and presence of glyphosate. Adaptability characteristics of these plants were evaluated, such as their herbicide survival, aboveground dry mass, produced seeds dry mass and relative fitness to these characteristics. In the second work, we tried to determine effects of different densities (30 and 130 plants m<sup>2</sup>) of each of

these genotypes on soybean yield, with and without glyphosate application. For that, the final soybean yield and the aboveground dry mass accumulated by the goosegrass plants were evaluated. In the absence of the herbicide the genotypes WT and P106S presented similar behavior. With herbicide, P106S and TIPS were similar. Competition with soybean reduced the benefits and raised the costs of resistance, especially for TIPS genotype. The interference caused by the P106S and WT genotypes was greater than that caused by the TIPS genotype without the herbicide. The application of glyphosate, even in resistant plants favored high soybean yield, due to the effects of the herbicide in P106S genotype and the mutations present in the TIPS goosegrass.

**Keywords:** *Eleusine indica*, fitness, *Glycine max*, P106S, TIPS, WT

## INTRODUÇÃO

O capim-pé-de-galinha é uma planta daninha de fisiologia do tipo C4, que apresenta rápido crescimento e elevada produção de sementes, sendo considerada uma das piores infestantes do mundo (GANESHIAH; SHAANKER, 1982). Devido a sua alta adaptabilidade a diferentes ambientes, torna-se competitiva quando em convívio com culturas agrícolas, reduzindo muitas vezes a produtividade dessas (TAKANO et al., 2016; BARROSO; YAMAUTI; ALVES, 2010; CHAUHAN; JOHNSON, 2008).

Além da agressividade, o capim-pé-de-galinha apresenta elevado histórico de resistência a diversos mecanismos de ação de herbicidas (HEAP, 2017). O primeiro relato de resistência ao glyphosate para o capim-pé-de-galinha ocorreu em 1997, em pomares da Malásia (LEE; NGIM, 2000). Em 2015, a dupla mutação do gene EPSPS foi descrita em genótipos de capim-pé-de-galinha e também relatada uma população com superexpressão da EPSPS na China (CHEN, et al., 2015; YU, et al., 2015). Em 2016, a presença do capim-pé-de-galinha resistente ao glyphosate foi relatada também no Brasil (TAKANO et al., 2017).

A presença de plantas daninhas resistentes, nesse caso do capim-pé-de-galinha, não é apenas influenciada pela aplicação do herbicida. Existem outros fatores, como ecológicos, fisiológicos e genéticos, que irão determinar a permanência dos alelos resistentes no campo. A combinação desses múltiplos fatores determina duas importantes características, denominada de benefício e custo da resistência (MAXWELL; MORTIMER, 1994; SIMMS; RAUSHER, 1987).

O benefício da resistência (BR) é determinado pela sobrevivência e pela fecundidade da planta, resultantes do mecanismo de resistência sobre aplicação e seleção do herbicida. Pode ser determinado como uma medida de eficiência bioquímica do mecanismo de resistência que protege a planta do herbicida. É função particular do herbicida e sua dose, da mutação genética presente na planta, do número de alelos mutados e das condições ambientais (VILA-AIUB et al., 2005; BECKIE; TARDIF, 2012; BOSTAMAM et al., 2012; ROUX; GASQUEZ; REBOUD, 2005).

Espera-se que plantas que possuam alelos causadores de resistência a herbicidas apresentem custo de desenvolvimento se comparadas às que apresentam alelos selvagens (custo de resistência, CR), que pode ser medido apenas na ausência do fator de seleção, nesse caso o herbicida (VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009; BERGELSON; PURRINGTON, 1996). Porém, esse custo não é regra e também depende de diversos fatores ecológicos (VILA-AIUB et al., 2011; ROUX et al., 2004).

Conhecer o “fitness” de uma planta daninha resistente é essencial para o manejo adequado da espécie. Plantas que apresentem alto benefício de resistência e baixo ou ausente custo de resistência irão, na ausência do herbicida, evoluir de maneira muito rápida no agroecossistema. Ao contrário, plantas com poucos benefícios e altos custos tendem a não se disseminar na ausência do herbicida. Esses resultados serão os primeiros a estimar o benefício de fitness e o custo da resistência conferidos por mutações duplas na EPSPS. Trabalhos desse tipo não existem na literatura, pois na maioria das vezes deixa-se de estudar a fecundidade dos genótipos resistentes.

Sendo assim, objetivou-se com este trabalho avaliar os níveis de benefício e custo da resistência dos genótipos P106S e TIPS do capim-pé-de-galinha, em comparação ao genótipo selvagem, na presença/ausência do glyphosate e da soja como competidora e, ainda, os efeitos de diferentes densidades desses genótipos na produtividade final dessa cultura.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Material vegetal*

Dois experimentos foram realizados entre os anos de 2016 e 2017, um no “Instituto de Investigaciones Fisiológicas y Ecológicas Vinculadas ala Agricultura” - IFEVA, localizado na Faculdade de Buenos Aires - UBA, Buenos Aires, Argentina (34°35'27,97”S; 58°28'46,09”O) e outro na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, em Jaboticabal – Brasil (21°14'43.42”S; 48°17'32.80”W). Sementes de *Eleusine indica* (planta autógama) foram coletadas em campos de produção de palma na Malásia, na região de Jahor. Essa população apresentou genótipos resistentes e suscetíveis ao herbicida glyphosate (JALALUDIN et al., 2010).

Esses genótipos foram selecionados, sendo eles: genótipo selvagem (WT - suscetível), mutantes para Pro-106-Ser (P106 - resistente) e mutantes para Pro-106-Ser + Thr-102-Ile (TIPS - resistente). Os genótipos selecionados apresentaram-se homozigóticos e foram isolados em condições de casa de vegetação para produção de sementes (JALALUDIN et al., 2014). A progênie de cada planta originada das linhas puras foi analisada por marcadores moleculares para a confirmação das mutações no gene EPSPs, e as sementes restantes, utilizadas neste trabalho (anexo1). Essas mesmas sementes foram utilizadas em outros trabalhos nos quais a resistência/suscetibilidade de cada genótipo foi também confirmada (YU et al., 2015). Até o presente momento, sabe-se que estes genótipos apresentam unicamente como mecanismo de resistência ao glyphosate a(s) mutação(ões) no gene EPSPs.

A soja (*Glycine max*) utilizada nos experimentos foi a cultivar DM4614-IPRO (DonMario, Buenos Aires), no experimento em Buenos Aires, e a soja M7110 – IPRO (Monsanto, São José dos Campos), no Brasil, ambas tolerantes ao glyphosate com hábito de crescimento indeterminado.

*Benefício (P106S vs TIPS) e Custo da Resistência (WT vs P106S vs TIPS)*

Este experimento foi conduzido em vasos em condições semicontroladas, durante os meses de dezembro/março, avaliando-se os efeitos dos genótipos (WT, P106S e TIPS), do glyphosate (0 e 1.080 g ha<sup>-1</sup>) e da competição com a soja (controle e 55 plantas m<sup>-2</sup>), no crescimento vegetativo e reprodutivo do capim-pé-de-galinha. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, separando-se a aplicação ou não do glyphosate, com esquema fatorial 3x2 para cada, em quatro repetições.

Sementes dos genótipos WT, P106S e TIPS e soja foram semeadas em vasos de 30 litros (30 cm x 30 cm x 30 cm) contendo um substrato orgânico composto das mesmas proporções entre solo orgânico, areia e turfa. Depois que o capim-pé-de-galinha germinou e emergiu, ele foi desbastado para duas plantas por vaso (22 plantas m<sup>-2</sup>). Nos tratamentos com glyphosate, esse desbaste ocorreu após a aplicação do herbicida. Utilizou-se maior densidade de semeadura inicial para o genótipo P106S, pois esperava-se um porcentual de mortalidade de plantas (YU et al., 2015). Por ocasião da semeadura do capim-pé-de-galinha, quatro sementes de soja foram semeadas nos mesmos vasos (44 plantas m<sup>-2</sup>), conforme a Figura 1.

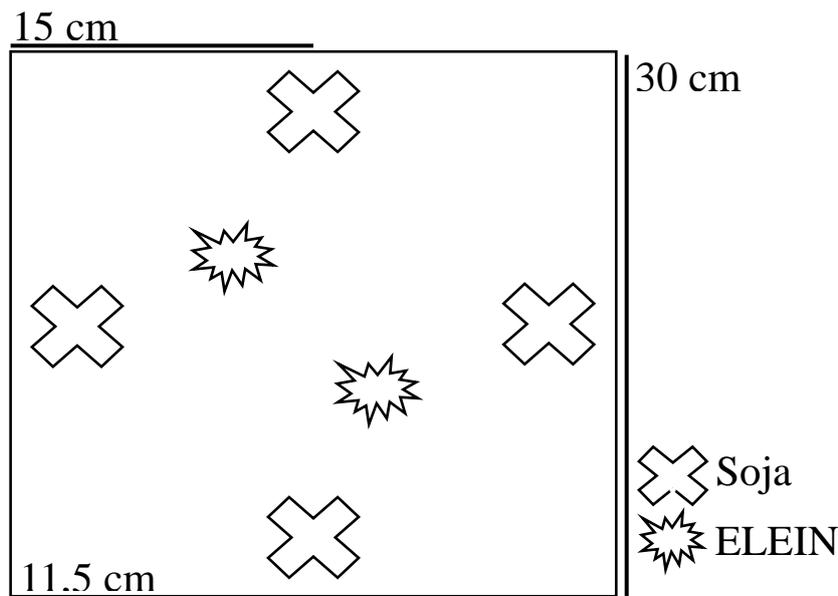


Figura 1. Esquema final do arranjo de plantas de *Eleusine indica* e soja, após os desbastes realizados.

Na ocasião da emissão da quarta folha do capim-pé-de-galinha (coincidindo com o estágio de dois trifólios da soja), as plantas foram tratadas com 1.080 g ha<sup>-1</sup> de glyphosate (Roundup Control Max, Monsanto, Argentina), utilizando-se de uma câmara de aplicação equipada com jato do tipo leque plano, aplicando 140 L ha<sup>-1</sup> de calda, pressurizada a 200 kPa, e velocidade de 2,0 km h<sup>-1</sup>. Por ocasião da emissão do quarto trifólio da soja, os vasos foram adubados (kg ha<sup>-1</sup>) com: 53 N; 48 P; 79 K; 12 Mg; 0,83 Fe; 0,06 B; 0,08 Zn e 0,08 Mn. Os vasos foram regados visualmente, sempre que necessário. A sobrevivência dos genótipos ao herbicida foi avaliada vinte e um dias após o tratamento. A sanidade das plantas foi mantida pela aplicação de cipermetrina e deltametrina, quinzenalmente, durante a condução do experimento, para o controle de lagartas nas plantas do capim-pé-de-galinha, e de tripes na soja.

Algumas características dos genótipos foram estimadas a fim de se entender os padrões de alocação de recursos para os tecidos vegetativos e reprodutivo da planta. Na maturação das plantas (94 dias desde sua germinação), os genótipos de capim-pé-de-galinha WT, P106S e TIPS tiveram sua biomassa aérea colhida e seca em estufa com circulação forçada de ar a 80°C, por 72 horas, para a determinação da massa seca aérea. As inflorescências com sementes maduras produzidas pelas plantas foram coletadas diariamente, desde a primeira maturação até a última avaliação. As inflorescências imaturas também foram coletadas na última avaliação e somadas à massa seca aérea. As inflorescências de cada planta foram debulhadas para separar as sementes das palhas, estimando-se a massa total de sementes. A massa seca de sementes dividida pela soma da massa seca aérea, mais a massa seca de sementes (massa seca total) acumulada por planta, determinaram o esforço reprodutivo.

Uma análise de variância (ANOVA) foi realizada para determinar o efeito de cada genótipo, do glyphosate e da competição com a soja, em cada característica de adaptabilidade avaliada, separando-se os dados entre aplicação ou não do herbicida glyphosate.

O fitness ( $W$ ) de cada planta depende igualmente da proporção de plantas que sobrevivem ( $S$ ) ao glyphosate e dispersam suas sementes, e da fecundidade ( $F$ ) dessas plantas na maturidade ou no crescimento vegetativo ( $C$ ) ( $W = S \times F$  ou  $W = S$

x C) (FUTUYMA, 2013). Com a estimativa de sobrevivência e da fecundidade (nesse caso, massa seca de sementes produzidas por planta) sobre a aplicação de glyphosate e competição, o fitness dos genótipos WT, P106S e TIPSP foi estimado como relativo ao maior fitness pela equação 2, calculando-se o benefício da resistência ao herbicida.

$$[\text{Eq.2}] W_a = \frac{S_a F_a}{S_f \cdot F_f}$$

Em que o fitness de um genótipo “a” ( $W_a$ ) é igual à contribuição linear de sua sobrevivência ( $S_a$ ) e fecundidade ( $F_a$ ) sobre o tratamento do herbicida relativo à sobrevivência ( $S_f$ ) e à fecundidade ( $F_f$ ) do genótipo de maior fitness “f”.

A soja teve, por ocasião da coleta final de sementes do capim-pé-de-galinha, suas vagens colhidas e pesadas. Esses valores foram submetidos à análise de variância com as médias dos dados, a qual, quando significativa, teve suas médias comparadas pelo teste de Fisher ( $p \leq 0,05$ ), pelo programa estatístico InfoStat®.

O custo da resistência, neste caso, foi calculado para a ausência do herbicida glyphosate, seguindo a equação 3.

$$[\text{Eq. 3}] CR = 1 - (W_r/W_s)$$

Em que o custo de resistência (CR) é calculado pela divisão do fitness (W) do genótipo resistentes  $W_r$  (P106S e TIPS) pelo fitness do genótipo suscetível  $W_s$  (WT). Custos de resistência variam de 0,99 (altos custos) a 0 (baixo custo). Valores negativos denotam vantagens adaptativas do genótipo resistente sobre o suscetível, na ausência do agente selecionado, neste caso o herbicida.

#### *Efeitos competitivos do capim-pé-de-galinha (WT, P106 e TIPS) na soja*

Este experimento foi conduzido em vasos em condições semicontroladas, durante os meses de setembro a fevereiro, avaliando-se os efeitos do genótipo (WT, P106S e TIPS), do glyphosate (0 e 1.080 g ha<sup>-1</sup>) e da densidade de plantas do capim-pé-de-galinha (0; 30 e 130 plantas m<sup>2</sup>), na produtividade da soja (33 plantas m<sup>2</sup>). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com esquema

fatorial 3x2x3, em quatro repetições. As espécies foram germinadas no próprio substrato e posteriormente desbastadas para as respectivas densidades (Figura 2).

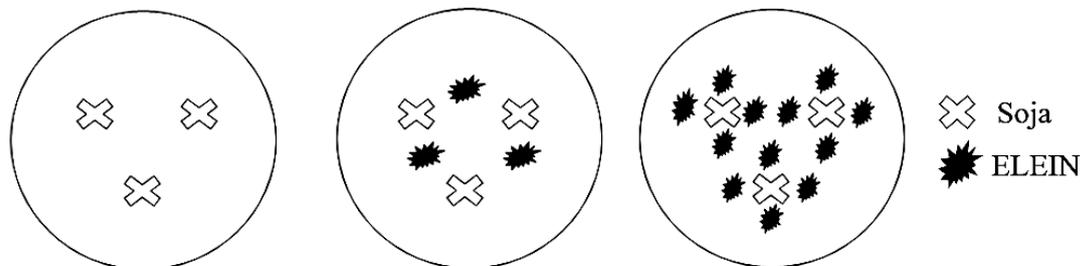


Figura 2. Esquema final do arranjo de plantas de *Eleusine indica* e soja, após os desbastes realizados.

Foram utilizados vasos com capacidade para 30 litros preenchidos com Latossolo Vermelho-Escuro com as seguintes características: pH: 6,7; MO: 10 g dm<sup>-3</sup>, P-(res.): 18 mg dm<sup>-3</sup>; K, Ca, Mg, H+Al, SB, T e V(%): 0,9; 54; 14; 11; 69; 80,1 mmolc dm<sup>-3</sup> e 86%, respectivamente; e teores de argila, silte, areia fina e areia grossa de: 60; 20; 14 e 6 %, respectivamente. Por ocasião da semeadura, esses vasos foram adubados com 400 kg ha<sup>-1</sup> da formulação 4-14-8 (N-P-K). As plantas foram irrigadas sempre que visualmente necessário, e a fitossanidade, mantida pela aplicação de fungicidas (epoxiconazol + piraclostrobina), acaricida (espiroclifeno) e inseticidas (tiametoxam+ lambda-cialotrina) para o controle de lagartas, tripes e oídio.

Nos tratamentos com a aplicação de glyphosate, essa ocorreu por ocasião da emissão da quarta folha pelo capim-pé-de-galinha (coincidindo com dois trifólios expandidos da soja). Aplicaram-se 1.080 g e.a. ha<sup>-1</sup> de glyphosate (Roundup Ready, Monsanto, Brasil, São José dos Campos) utilizando-se de pulverizador costal de pressão constante (CO<sub>2</sub>), acoplado a uma barra de dois metros e quatro pontas de pulverização modelo XR 100.02 (TeeJet), previamente calibrado para consumo de calda de 200 L ha<sup>-1</sup>, com pressão de 200 kPa e velocidade de 2 km h<sup>-1</sup>.

Por ocasião do final do ciclo do capim-pé-de-galinha (124 dias), as plantas tiveram sua parte aérea cortada rente ao solo, sendo essas submetidas a secagem em estufa com circulação forçada de ar (60°C), por 72 horas, para posterior

obtenção da massa seca aérea. Ao final de ciclo (140 dias), as vagens de soja foram colhidas, e seus grãos trilhados para a obtenção da produtividade estimada, corrigida para 13% de umidade. A produtividade da soja e a massa seca aérea das plantas de capim-pé-de-galinha foram submetidas à análise de variância com as médias, que quando significativa, comparadas pelo teste de Fisher ( $p \leq 0,05$ ), pelo programa estatístico InfoStat®.

## RESULTADOS

### *Benefício (P106S vs TIPS) e Custo da Resistência (WT vs P106S vs TIPS).*

Com relação ao desenvolvimento da parte aérea não reprodutiva das plantas de capim-pé-de-galinha, notou-se que, na ausência do herbicida glyphosate, não ocorreram interações entre o crescimento de genótipos e a convivência ou não com plantas de soja, diferentemente do que ocorreu na presença do herbicida. Para a massa seca de sementes e esforço reprodutivo, houve interações sem e com a aplicação do glyphosate (Tabela 1).

Tabela 1. Efeitos do genótipo (G), da interferência ou não com plantas de soja (I) e da interação entre esses fatores (G x I), na massa seca aérea, massa seca de sementes e esforço reprodutivo do capim-pé-de-galinha, sem e com a aplicação do herbicida glyphosate (1.080 g e.a. ha<sup>-1</sup>).

Massa Seca Aérea	Sem glyphosate		Com glyphosate	
	F	p	F	p
G	106,69	<0,0001	210,94	<0,0001
I	459,24	<0,0001	755,82	<0,0001
G x I	2,62	0,1267	189,09	<0,0001
Massa Seca Sementes	Sem glyphosate		Com glyphosate	
	F	p	F	p
G	74,39	<0,0001	176,13	<0,0001
I	208,77	<0,0001	662,08	<0,0001
G x I	7,82	0,0043	162,08	<0,0001
Esforço reprodutivo	Sem glyphosate		Com glyphosate	
	F	p	F	p
G	8,49	0,0025	120,05	<0,0001
I	6,3	0,0218	3,5	0,0776
G x I	3,47	0,0532	3,5	0,0519

Na ausência do herbicida, as plantas dos genótipos WT e P106S apresentaram maior desenvolvimento (em média 54%) do que as plantas do genótipo TIPS, competindo ou não com a soja. A competição entre espécies, neste caso, diminuiu para todos os genótipos o acúmulo de massa seca no período avaliado. Na presença do herbicida, sem competir com a soja, os genótipos P106S e TIPS obtiveram igual crescimento, já que as plantas do genótipo WT morreram após a aplicação do glyphosate. Convivendo com a soja, os crescimentos dos genótipos P106S e TIPS foram reduzidos em 98 e 96,5%, respectivamente. Ambos os genótipos resistentes obtiveram iguais crescimentos na ausência ou na presença da competição com a aplicação do glyphosate (Figura 3).

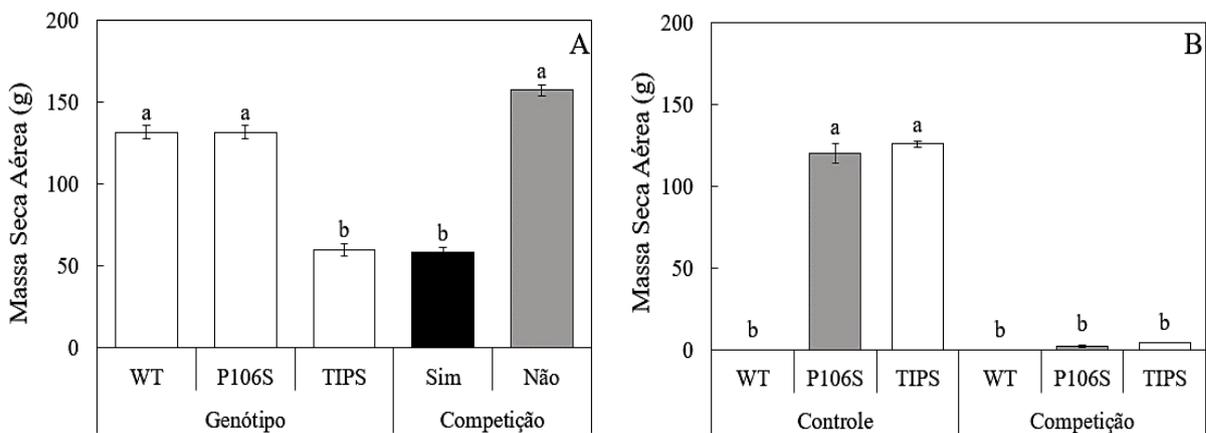


Figura 3. Massa seca aérea de plantas de capim-pé-de-galinha dos genótipos WT, P106S e TIPS (barras brancas), competindo ou não com soja (barra preta e barra cinza) sem a aplicação de glyphosate (A) e dos genótipos WT (barra preta), P106S (barra cinza) e TIPS (barra branca) competindo ou não com a soja com a aplicação de glyphosate (1.080 g e.a. ha<sup>-1</sup>) (B). Barras verticais denotam o erro-padrão da média (n = 4). Diferentes letras indicam diferenças significativas, de acordo com o teste de DMS de Fisher (p≤0,05).

Na ausência do herbicida, as plantas dos genótipos WT e P106S obtiveram maior produção de sementes do que as plantas do genótipo TIPS competindo ou não com a soja. A competição entre espécies, neste caso, diminuiu para todos os genótipos a produção de sementes, porém de maneira mais acentuada para as plantas do genótipo TIPS. Na presença do herbicida, sem competir com a soja, os genótipos P106S e TIPS produziram sementes de maneira semelhante. Não ocorreu produção de sementes do genótipo WT, já que as plantas foram controladas pelo

herbicida. Convivendo com a soja, reduziram-se as produções de sementes nos genótipos P106S e TIPS em 98 e 96,5%, respectivamente. Ambos os genótipos resistentes obtiveram iguais produção de sementes na ausência ou na presença da competição (Figura 4).

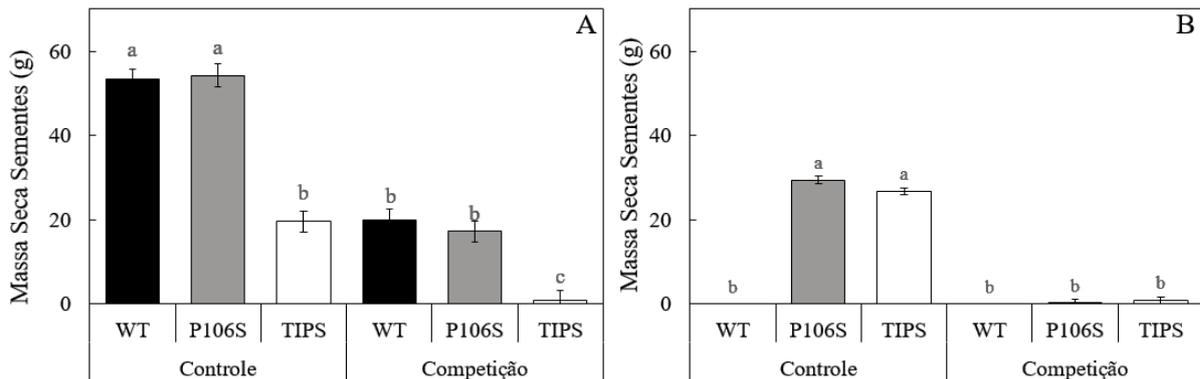


Figura 4. Massa de sementes do capim-pé-de-galinha dos genótipos selvagem (WT) (barra preta), P106S (barra cinza) e TIPS (barra branca) competindo ou não com a soja, sem (A) e com (B) a aplicação de glyphosate (1.080 g e.a. ha<sup>-1</sup>). Barras verticais denotam o erro-padrão da média (n = 4). Diferentes letras indicam diferenças significativas, de acordo com o teste de DMS de Fisher (p<0,05).

Sem o glyphosate e sem a competição, plantas dos genótipos WT e P106S alocaram maiores recursos para reprodução do que o genótipo TIPS. Em competição, os genótipos alocaram quantidades semelhantes de recursos destinados à reprodução. A competição diminuiu a alocação de recursos reprodutivos para os genótipos WT e P106S, em 20 e 25,4%, respectivamente (Figura 5). Na presença do herbicida, sem competição, WT e P106S alocaram semelhantes recursos para reprodução, enquanto competindo o genótipo TIPS alocou mais recursos destinados à reprodução do que o genótipo P106S. Fica claro que a queda no esforço reprodutivo ocorre apenas para os genótipos WT e P106S, sendo que se mantém para plantas do genótipo TIPS, independentemente da aplicação do herbicida ou da convivência com outras plantas (Figura 5).

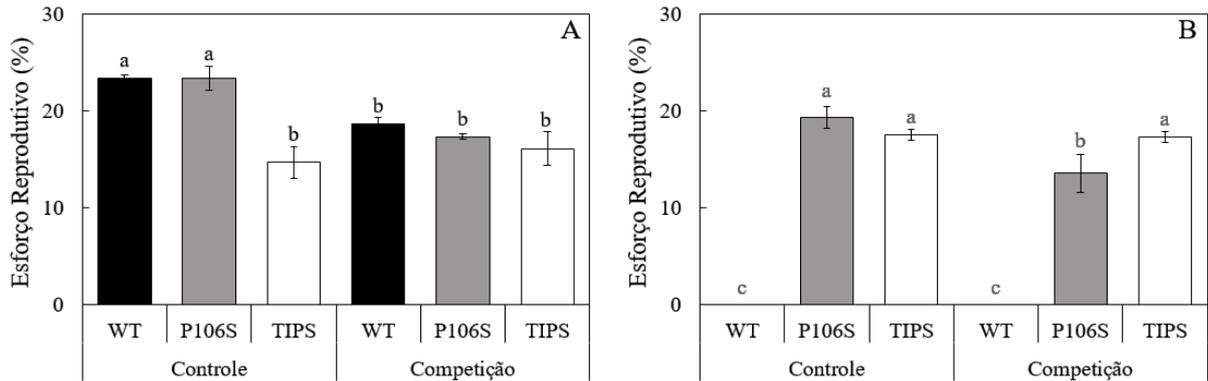


Figura 5. Esforço reprodutivo de plantas do capim-pé-de-galinha dos genótipos selvagem (WT) (barra preta), P106S (barra cinza) e TIPS (barra branca) competindo ou não com a soja, sem (A) e com (B) a aplicação de glyphosate (1.080 g e.a. ha<sup>-1</sup>). Barras verticais denotam o erro-padrão da média (n = 4). Diferentes letras indicam diferenças significativas, de acordo com o teste de DMS de Fisher (p≤0,05).

Na presença do herbicida glyphosate, o genótipo TIPS apresentou maior desenvolvimento aéreo e produziu maior quantidade de sementes que o genótipo P106S. Os maiores valores foram obtidos na ausência de competição das plantas com a soja. O genótipo TIPS obteve o dobro do fitness obtido pelo genótipo P106S. A competição do capim-pé-de-galinha com a soja afetou de maneira acentuada o fitness de ambos os genótipos, porém sendo três vezes maior o fitness obtido pelo genótipo TIPS, se comparado ao P106S (Tabela 2).

Para a produção de sementes, o genótipo TIPS também obteve o maior fitness na ausência de competição. Novamente esse fitness foi o dobro do genótipo P106S. O fitness obtido para a produção de sementes de ambos os genótipos, sob competição com a soja, foi semelhante ao obtido para o desenvolvimento vegetativo, sendo o fitness do genótipo TIPS três vezes superior ao fitness do genótipo P106S (Tabela 2).

A competição com as plantas de soja, neste caso, reduziu de maneira significativa o fitness de ambos os genótipos, em ambas as condições, mas de maneira acentuada para o genótipo P106S. Na média, as reduções do fitness do genótipo P106S foram de 49 e 54 vezes para produção de massa seca aérea e de

sementes, respectivamente, e de 33 vezes para ambas as condições de fitness do genótipo TIPS (Tabela 2).

Tabela 2. Benefício de fitness da resistência dos genótipos do capim-pé-de-galinha P106S e TIPS. O benefício de fitness foi estimado como o fitness relativo entre genótipos resultantes da combinação entre sobrevivência das plantas e o crescimento vegetativo ou produção de sementes, nas plantas tratadas com 1.080 g e.a. ha<sup>-1</sup> de glyphosate.

Benefício de Resistência - Fitness (W)*		
Genótipos	Biomassa Aérea	
	Controle	Competição
P106S	0,49	0,01
TIPS	1,00	0,03
Genótipos	Massa Sementes	
	Controle	Competição
P106S	0,54	0,01
TIPS	1,00	0,03

\* As médias de sobrevivência das plantas foram calculadas com base em 120 indivíduos para cada genótipo. O fitness (W) foi estimado em relação ao maior fitness encontrado (genótipo TIPS sem competição).

Na ausência do herbicida glyphosate, não ocorreram custos de resistência para o genótipo P106S, na ausência da competição com a soja, obtendo esse genótipo fitness superior de crescimento vegetativo e de produção de sementes do que o genótipo suscetível WT. O genótipo TIPS, na ausência de competição, obteve custos de resistência de 34 e 65% para a produção de massa vegetativa e de sementes, respectivamente (Tabela 3).

Em competição, todos os genótipos resistentes apresentaram custos. O genótipo P106S, porém, apresentou baixos custos comparados ao genótipo WT, que variaram entre 8 e 17% para a produção de massa seca vegetativa e reprodutiva, respectivamente. O TIPS apresentou elevado custo de resistência, em torno de 95% para ambas as características avaliadas. Notou-se, portanto, que o genótipo P106S não apresenta nenhum ou baixo custo de resistência, enquanto o genótipo TIPS apresenta valores elevados de custos, principalmente sob competição (Tabela 3).

Tabela 3. Estimativa do custo da resistência biológica e ecológica para os genótipos P106S e TIPS do capim-pé-de-galinha. O custo de resistência foi avaliado em termos de massa seca aérea e massa seca de sementes com e sem a competição com a soja, em relação ao genótipo suscetível (WT). Valores menores que um indicam vantagem de fitness do genótipo resistente sobre o suscetível, na ausência da seleção do herbicida.

Genótipos	Massa seca aérea	
	Controle	Competição
P106S	- 0,04	0,08
TIPS	0,34	0,95
Genótipos	Massa seca sementes	
	Controle	Competição
P106S	-0,04	0,17
TIPS	0,65	0,96

*Efeitos competitivos do capim-pé-de-galinha (WT, P106 e TIPS) na soja.*

Com relação às características reprodutivas da soja, em ambos os experimentos a produção de vagens sofreu efeitos dos diferentes genótipos e da aplicação do glyphosate, mas não da interação entre esses fatores (Tabela 4).

Tabela 4. Efeitos do genótipo (G) e da aplicação de glyphosate (A) na biomassa reprodutiva e na produtividade da soja.

Biomassa reprodutiva/ Produtividade	Experimento 1		Experimento 2	
	F	p	F	p
G	4,84	0,0208	5,18	0,0105
A	26,94	0,001	25,96	<0,0001
G x A	0,13	0,8766	0,52	0,5976

Para a biomassa total reprodutiva no experimento um, o genótipo TIPS interferiu menos do que o genótipo WT. O genótipo P106S exerceu efeito semelhante aos demais. No experimento dois, a convivência com o genótipo TIPS foi a que menos interferiu no desenvolvimento e na produtividade da soja. A interferência na produtividade da soja, causada pelo convívio de plantas WT e P106S, foi semelhante, estatisticamente, semelhante ao experimento um (Figura 5).

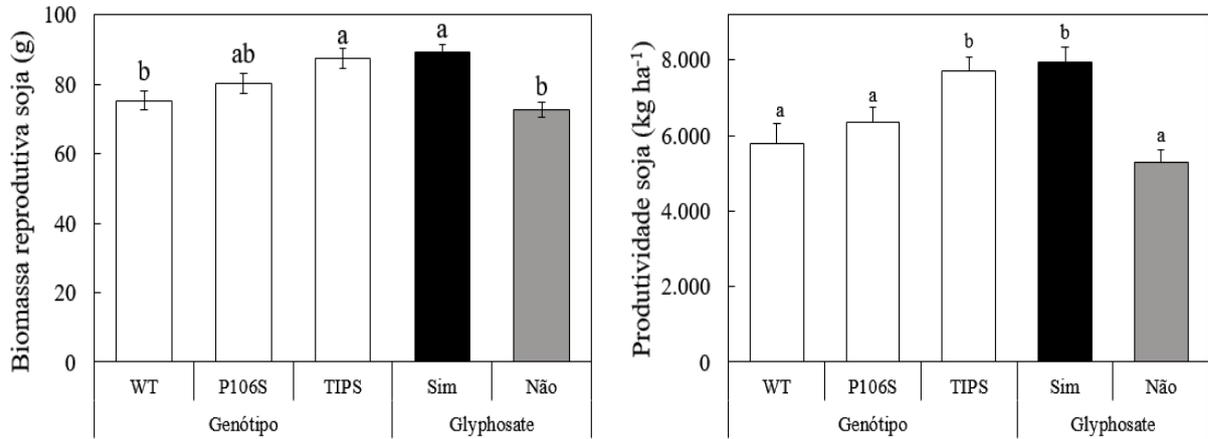


Figura 5. Efeitos de plantas de *Eleusine indica* dos genótipos WT, P106S e TIPS (barras brancas) e da aplicação (1.080 g e.a. ha<sup>-1</sup>) ou não de glyphosate (barra preta e cinza, respectivamente), na produtividade média da soja. Plantas de *Eleusine indica* crescendo nas densidades de 30 e 130 plantas m<sup>-2</sup>. Barras verticais denotam o erro-padrão da média (n = 6-10). O valor de p e as diferentes letras indicam diferenças significativas entre os genótipos, de acordo com o teste de Fischer a 5%.

Em ambos os experimentos, aplicação de glyphosate diminuiu a interferência causada pelo capim-pé-de-galinha na soja, pois garantiu maior produção de vagens e, conseqüentemente, maior produtividade média à cultura. A aplicação nesse caso anulou a interferência do genótipo WT, pois todas as plantas foram mortas e implicou penalidades no desenvolvimento vegetativo do genótipo P106S.

Essas diferenças de crescimento são reforçadas com os dados observados, nos quais, na ausência do herbicida, o genótipo selvagem (WT), suscetível ao glyphosate, cresceu de maneira semelhante ao genótipo resistente P106S, sendo ambos superiores em seu desenvolvimento, se comparados ao genótipo resistente TIPS (Tabela 3).

Plantas dos genótipos WT e P106S acumularam 2,7 vezes mais biomassa do que o genótipo TIPS durante o período avaliado. Na presença do herbicida, o genótipo P106S obteve desenvolvimento semelhante ao TIPS. As plantas selvagens morreram com a aplicação do herbicida. Plantas do genótipo P106S tiveram seu crescimento reduzido em 79% com a aplicação do glyphosate, enquanto plantas do genótipo TIPS, em média 30% (Figura 6).

Tabela 3. Efeitos do genótipo (G) e da aplicação de glyphosate (A) na biomassa aérea de plantas de capim-pé-de-galinha.

Biomassa aérea	F	p
G	9,06	0,0009
A	8,1	0,008
G x A	5,9	0,0216

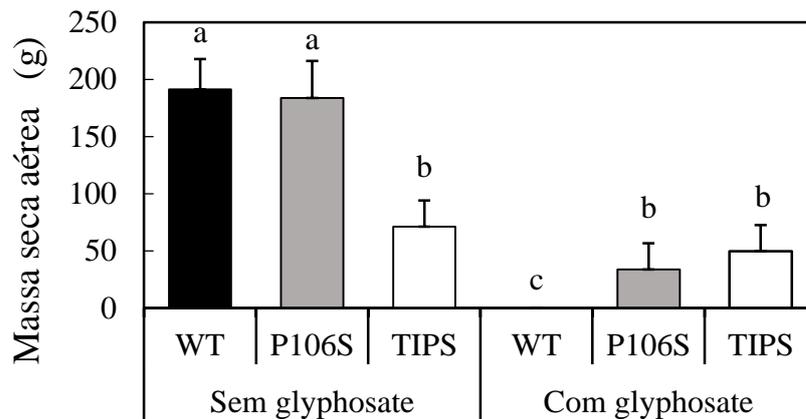


Figura 6. Massa seca aérea produzida por plantas de capim-pé-de-galinha selvagem (WT) (barra preta), P106S (barra cinza) e TIPS (barra branca) competindo com a soja, nas densidades de 30-130 plantas  $m^2$ , com e sem a aplicação de glyphosate ( $1.080 \text{ g e.a. ha}^{-1}$ ). Barras verticais denotam o erro-padrão da média ( $n = 4-8$ ). O valor de p e as diferentes letras indicam diferenças significativas entre os genótipos, de acordo com o teste de Fisher a 5%.

## DISCUSSÃO

Com relação ao desenvolvimento vegetativo e à produção de sementes, notou-se que para ambos os experimentos, o genótipo resistente P106S apresentou, na ausência do herbicida glyphosate, comportamento semelhante ao genótipo suscetível WT. Esse fitness semelhante entre genótipos foi refletido no custo da resistência do genótipo P106S, que chegou a ser negativo quando comparado ao WT, na ausência da soja, indicando superioridade nesse caso do genótipo resistente P106S, frente ao suscetível WT. Nesse caso, a mudança de bases na posição parece não conferir mudanças perceptíveis no desenvolvimento vegetal, nas plantas do genótipo P106S, nas condições em que foi conduzido o experimento. Essas

mutações, sem prejuízos na ligação da enzima com o substrato, ocorrem também para outras espécies, como observado no capim-amargoso, que apresenta mutações na enzima EPSPS, sem prejuízos em seu crescimento (GALEANO et al., 2016).

Para os genótipos resistentes, na ausência do herbicida e da competição entre plantas, o genótipo P106S mostrou maior produção frente ao TIPS, que foi por vezes inferior também ao desenvolvimento do genótipo WT. Em competição, todos os genótipos reduziram seu desenvolvimento, chegando, por exemplo, o genótipo TIPS a apresentar custo de resistência de 95%. Tem-se relatado que a dupla mutação na enzima EPSPS reduz a afinidade dessa com seu substrato; neste caso, o fosfoenolpiruvato impacta a produção de aminoácidos e o desenvolvimento das plantas (YU et al., 2015; MAEDA; DUDAREVA, 2012). Esses valores estão bem próximos aos observados em outros trabalhos, como, por exemplo, na resistência a inibidores da ALS em *Amaranthus powellii*, que em competição entre plantas apresentou os mesmos custos de resistência (TARDIF; RAJCAN; COSTEA, 2006).

Com a aplicação do glyphosate, as plantas WT foram controladas. O genótipo P106S sofreu com a aplicação do herbicida, enquanto o TIPS não, fazendo com que o benefício de fitness, na ausência de competição, fosse maior para o TIPS. Esse efeito de fitointoxicação do genótipo P106S deve-se à não total insensibilidade da enzima ao herbicida glyphosate, como já relatado em outros trabalhos (SAMMONS; GAINES, 2014; ALIBHAI et al., 2010). Em alguns casos, por conferir baixos níveis de resistência às plantas, pode ocorrer mortalidade de plantas, mesmo das que apresentem essa mutação (KAUNDUN et al., 2011; KAUDUN et al., 2008).

A insensibilidade diferencial ao herbicida entre esses genótipos está relacionada à ligação do glyphosate na EPSPS. Tem-se que para inibir a atividade da EPSPS pela metade, em plantas com mutações na posição 106 da enzima, são necessários 87  $\mu\text{M}$  de glyphosate, enquanto essa concentração é de 53.000  $\mu\text{M}$  para plantas com dupla mutação, como o genótipo TIPS (YU et al., 2015). Decorrente dessa fitointoxicação no genótipo P106S, na presença do herbicida, o desenvolvimento dos genótipos resistentes foi semelhante nos dois experimentos.

Em todos os casos e para as características avaliadas, observou-se que a competição entre plantas de capim-pé-de-galinha e soja impactou ainda mais as

penalidades observadas no desenvolvimento das plantas resistentes. Espera-se que a presença de estresses, sejam eles bióticos, sejam eles abióticos, eleve os custos de resistência das plantas daninhas, como aqui observado (BERGELSON; PURRINGTON, 1996; MARAK; BIERE; VAN DAMME, 2003).

Devido aos comportamentos supracitados, a soja sofreu maiores reduções de produtividade quando em convivência com os genótipos WT e P106S. A aplicação do glyphosate assegurou maiores produções à cultura, mesmo tratando-se de plantas resistentes, pois a fitointoxicação causada ao genótipo P106S e o custo de resistência presente no genótipo TIPS, somados ao desenvolvimento da cultura, foram suficientes para diminuir a interferência.

Do ponto de vista evolutivo, recomenda-se, em qualquer área com resistência ao glyphosate, dentre as práticas de manejo, a troca do mecanismo de ação do herbicida a ser aplicado. Pelos resultados aqui demonstrados, na ausência do herbicida glyphosate, tanto o genótipo selvagem (WT) como o resistente (P106S) tendem a evoluir e a aumentar suas densidades na área, pois crescem e produzem sementes de maneira semelhante. Sendo assim, a não aplicação do glyphosate não tende, a longo prazo, a diminuir o banco de sementes P106S, apenas do genótipo TIPS, que apresentou elevados custos de resistência. Na presença do herbicida, tendem a perpetuar-se na área os genótipos P106S e TIPS, que se desenvolvem de maneira semelhante com a aplicação do glyphosate.

Nas aplicações, misturas com o herbicida glyphosate podem ser realizadas, mas deve-se atentar para as misturas utilizadas, evitando-se a seleção de populações a outros herbicidas, como as encontradas na Malásia e na Indonésia (HEAP, 2017). Ressalta-se, ainda, que podem existir outros fatores aqui não estudados que irão impactar de maneira mais acentuada a interferência dessas plantas daninhas nas culturas, modificando as conclusões aqui apresentadas, como, por exemplo, épocas de emergência de plantas, disponibilidade de nutrientes e água no solo, dentre outras.

## CONCLUSÃO

Sem o glyphosate, os genótipos WT e P106S apresentam comportamento semelhante; com o herbicida, passam a comportar-se de maneira semelhante os genótipos P106S e TIPS. A interferência causada pelos genótipos P106S e WT é maior do que a causada pelo genótipo TIPS. A aplicação do herbicida, mesmo que em plantas resistentes, favoreceu a alta produtividade da soja, seja devido aos efeitos do herbicida, seja devido às mutações presentes no capim-pé-de-galinha.

## REFERÊNCIAS

ALIBHAI, M. F.; CAJACOB, C.; FENG, P. C.; HECK, G. R.; QI, Y.; FLASINKSKI, S.; STALLINGS, W. C. Glyphosate resistant class I 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS). Google Patents, 2010.

BARROSO, A. A. M.; YAMAUTI, M. S.; ALVES, P. L. C. A. Interferência entre espécies de plantas daninhas e duas cultivares de feijoeiro em duas épocas de semeadura. **Bragantia**, v. 69, p. 609-616, 2010.

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

BERGELSON, J.; PURRINGTON, C. B. Surveying patterns in the cost of resistance in plants. **American Naturalist**, v. 148, p. 536-558, 1996.

BOSTAMAM, Y.; MALONE, J. M.; DOLMAN, F. C.; BOUTSALIS, P.; PRESTON, C. Rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) populations containing a target site mutation in EPSPS and reduced glyphosate translocation are more resistant to glyphosate. **Weed Science**, v. 60, p. 474-479, 2012.

CHAUHAN, B. S.; JOHNSON, D. E. Germination ecology of goosegrass (*Eleusine indica*): an important grass weed of rainfed rice. **Weed Science**, v. 56, p. 699-706, 2008.

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

FUTUYMA, D. J. **Evolution**. Sunderland, MA: Sinauer, 2013. 656p.

GALEANO, E.; BARROSO, A. A. M.; VASCONCELOS, T. S.; LÓPEZ-RUBIO, A.; ALBRECHT, A. J. P. A.; VICTORIA-FILHO, R.; CARRER, H. EPSPS variability, gene expression, and enzymatic activity in glyphosate-resistant biotypes of *Digitaria insularis*. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, 2016.

GANESHIAH, K.; SHAANKER, R. U. Evolution of reproductive behaviour in the genus *Eleusine*. **Euphytica**, v. 31, p. 397–404, 1982.

HEAP. **The international survey of herbicide resistant weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org>>; Acesso em: 25 maio 2017.

JALALUDIN, A.; NGIM, J.; BAKAR, B. H.; ALIAS, Z. Preliminary findings of potentially resistant goosegrass (*Eleusine indica*) to glufosinate-ammonium in Malaysia. **Weed Biology and Management**, v.10, p. 256-260, 2010.

KAUNDUN, S. S.; DALE, R. P.; ZELAYA, I. A.; DINELLI, G.; MAROTTI, I.; MCINDOE, E.; CAIRNS, A. A novel P106L mutation in EPSPS and an unknown mechanism(s) act additively to confer resistance to glyphosate in a South African *Lolium rigidum* population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 3.227-3.233, 2011.

KAUNDUN, S. S.; ZELAYA, I. A.; DALE, R. P.; LYCETT, A. J.; CARTER, P.; SHARPLES, K. R.; MCINDOE, E. Importance of the P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in a goosegrass (*Eleusine indica*) population from the Philippines. **Weed Science**, v. 56, p. 637-646, 2008.

LEE, L. J.; NGIM, J. A first report of glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica* (L) Gaertn) in Malaysia. **Pest Management Science**, v. 56, p. 336–339, 2000.

MAEDA, H.; DUDAREVA, N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 73-105, 2012.

MARAK, H. B.; BIÈRE, A.; VAN DAMME, J. M. M. Fitness costs of chemical defense in *Plantago lanceolata* L.: Effects of nutrient and competition stress. **Evolution**, v. 57, p. 2519-2530, 2003.

MAXWELL, B.; MORTIMER, A. Selection for herbicide resistance. In: POWLES, S. B.; HOLTUM, J. A. M. (Ed). **Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry**. Boca Raton, FL: Lewis, 1994, p.1–25.

ROUX, F.; MATÉJICEK, A.; GASQUEZ, J.; REBOUD, X. Dominance variation across six herbicides of the *Arabidopsis thaliana* *csr1-1* and *csr1-2* resistance alleles. **Pest Management Science**, v. 61, p. 1089-1095, 2005.

ROUX, F.; GASQUEZ, J.; REBOUD, X. The dominance of the herbicide resistance cost in several *Arabidopsis thaliana* mutant lines. **Genetics**, v. 166, p. 449-460, 2004.

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

SIMMS, E. L.; RAUSHER, M. D. Costs and benefits of plant-resistance to herbivory. **American Naturalist**, v. 130, p. 570-581, 1987.

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.

TAKANO, H.K.; OLIVEIRA, JR., R. S.; CONSTANTIN, J.; BRAZ, G. B. P.; PADOVESE, J. C. Growth, development and seed production of goosegrass. **Planta Daninha**. v.34, p.249-258, 2016.

TARDIF, F. J.; RAJCAN, I.; COSTEA, M. A mutation in the herbicide target site acetohydroxyacid synthase produces morphological and structural alterations and reduces fitness in *Amaranthus powellii*. **New Phytologist**, v. 169, p. 251-264, 2006.

VILA-AIUB, M. M.; NEVE, P.; ROUX, F. A unified approach to the estimation and interpretation of resistance costs in plants. **Heredity**, v. 107, p. 386-394, 2011.

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.

VILA-AIUB, M. M.; NEVE, P.; STEADMAN, K. J.; POWLES, S. B. Ecological fitness of a multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* population: dynamics of seed germination and seedling emergence of resistant and susceptible phenotypes. **Journal of Applied Ecology**, v. 42, p. 288-298, 2005.

YU, Q.; ADAM, J.; 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. 67, p. 1440-1447, 2015.

## APÊNCIDE

## APÊNDICE A. Expressão proteica em plantas de azevém resistentes e suscetíveis ao glyphosate antes e após sua aplicação.

Tabela1. Lista das proteínas diferencialmente expressas em plantas de azevém suscetíveis e resistentes ao glyphosate antes da sua aplicação.<sup>1</sup>Acesso Pfam <sup>2</sup>+ proteínas reguladas positivamente e – proteínas reguladas negativamente em plantas suscetíveis.

Acesso <sup>1</sup>	Proteína	Expressão (NSAF)		Razão S-R <sup>2</sup>
		Suscetível	Resistente	
PF14697	4Fe-4S dicluster domain	0.066	0.024	+ 2.75
PF00076	Splicing factor 3b	0.005	0.000	+ 0.005
PF00012	Heat shock protein 70kDa	0.005	0.000	+ 0.005
PF00168	Multidrug resistance	0.004	0.000	+ 0.004
PF03947	50S ribossomal protein L2	0.003	0.000	+ 0.003
PF00155	Gamma-glutamyltransferase	0.003	0.000	+ 0.003
PF00274	Fructose-biphosphate aldolase	0.035	0.039	- 0.90
PF00162	3 phosphoglycerate kinase	0.013	0.017	- 0.76
PF01716	Oxygen-envolver enhancer protein	0.067	0.070	- 0.96
PF00004	26S proteasome regulatory complex	0.020	0.031	- 0.65
PF00044	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.024	0.029	- 0.83
PF00016	Ribulose-biphosphate carboxylase	0.135	0.184	- 0.73
PF00542	Ribosomal protein	0.024	0.025	- 0.96

Tabela 2. Lista das proteínas diferencialmente expressas em plantas de azevém suscetíveis e resistentes ao glyphosate após sua aplicação.<sup>1</sup>Acesso Pfam <sup>2</sup>+ proteínas reguladas positivamente e – proteínas reguladas negativamente em plantas suscetíveis. (Expressão maior do que 0,005).

Acesso <sup>1</sup>	Proteína	Expressão (NSAF)		Razão S-R <sup>2</sup>
		Suscetível	Resistente	
PF00162	Phosphoglycerate kinase 1	0.01	0.01	+ 2.53
PF00421	Photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein	0.02	0.01	+ 2.19
PF00044	26S proeasome regulatory complex	0.03	0.01	+ 1.92
PF00044	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.02	0.01	+ 1.90
PF00273	Fructose biphosphate aldolase	0.02	0.01	+ 1.83
PF01716	oxygen-envolving enhancer	0.05	0.03	+ 1.70
PF14697	4Fe-4S dicluster domain	0.03	0.03	+ 1.03
PF00016	Ribulose-biphosphate carboxylase	0.02	0.11	+ 0.15
PF00275	Photosystem II 10kDa phosphoprotein	0.00	0.030	-0.030
PF00504	Chlorophyll A-B binding	0.00	0.024	-0.024
PF02531	Photosystem I reaction center	0.00	0.024	-0.024
PF01789	Oxygen-envolving enhancer	0.00	0.023	-0.023
PF00283	Cytochrome B559 subunit	0.00	0.013	-0.013
PF00542	Ribosomal protein	0.00	0.009	-0.009
PF15511	Histone H4	0.00	0.008	-0.008
PF00033	Plastoquinol-plantocyanin reductase	0.00	0.008	-0.008
PF01333	Apocytochrome F.C-terminal	0.00	0.008	-0.008
PF08534	Peroxiredoxin	0.00	0.007	-0.007
PF00034	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.00	0.007	-0.007
PF00275	EPSPS synthase	0.00	0.007	-0.007
PF01434	Metalloprotease M41	0.00	0.006	-0.006
PF00009	Translation factor	0.00	0.006	-0.006

## **APÊNDICE B. Processo de obtenção e de purificação dos genótipos de capim-pé-de-galinha**

### *Sequenciamento da EPSPs e clonagem do cDNA*

Ressalta-se que estes processos foram realizados anteriormente ao experimento por outros autores, mas optou-se por serem inseridos neste trabalho a fim de possibilitar a repetitividade dos experimentos aqui descritos.

O DNA genômico foi extraído de tecidos foliares de plantas resistentes e suscetíveis, e o RNA total isolado usando um Kit (Plant RNeasy Mini Kit, Qiagen). A contaminação do DNA foi removida usando um kit (Turbo-DNA free kit, Ambion). Para o sequenciamento do DNA do EPSPs, um par de primers foi utilizado, amplificando uma região altamente conservada em que as mutações pontuais que conferem resistência ao glyphosate em plantas e em bactérias, foram encontradas (Sammons; Gaines, 2014). O primer “forward” foi designado como EleuSPSPSF (5'-GCGGTAGTTGTTGGCTGTGGTG-3'), e o primer “reverse”, como EleuSPSPSr (5'-TCAATCCGACAACCAAGTCGC-3') (Ng et al., 2003). Foram amplificados 301 pares de bases do DNA. Foi posteriormente conduzido um PCR com 25 µl do volume, constituído de 1-2 µl do DNA genômico ou cDNA, 0,5 µM de cada primer e 12,5 µl da enzima Taq (2x GoTaq Green Master Mix®, Promega).

A PCR rodou com o seguinte programa: 94°C por 4 minutos; 40 ciclos de 90°C por 30 segundos; 57°C (temperatura de anelamento) por 30 segundos, e 72°C por 30-50 segundos, seguida por uma extensão final de 7 minutos, a 72°C. O produto da PCR foi purificado em gel de agarose, utilizando-se de um kit (Wizard® SV Gel e PCR Clean-up System, Promega) e sequenciado por serviços terceirizados.

### *Desenvolvimento e genotipagem utilizando-se de marcadores dCAPS*

Baseado na informação adquirida pelo sequenciamento das plantas suscetíveis e resistentes (20 e 80 amostras), foram desenvolvidos marcadores dCAPS para detecção de alelos mutantes resistentes e suscetíveis (selvagens), nas

posições 102 e 106, respectivamente, usando um sistema baseado em rede (dCAPS web-basedfinder 2.0). A ausência do A ou T foi introduzida no primer “forward” RsaIF ((5'-TGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGIA-3'), mais dois nucleotídeos acima do sítio de mutação 102 (N+2), criando assim um sítio de restrição para RsaI (GT<sup>A</sup>AC) na sequência selvagem. Qualquer mutação resultando uma substituição da Thr-102 aboliria o sítio de restrição. Depois, o par de primers RsaIF e EleuSPSPr foi usado para amplificar um fragmento de 234 pares de bases que foi digerido com a enzima RsaI. O alelo selvagem (WT) geraria uma simples banda com fragmento de 208 pares de bases, enquanto a mutação no alelo 102 geraria uma banda não digerida de 234 pares de bases. Sequências heterozigóticas no 102 produziram ambas as bandas de 208 e 234 pares de bases.

Similarmente, uma troca G para C foi introduzida na sequência do primer “forward” Sau96IF (5'-CTCTTCTTGGGGAATGCTGGAACTGCAATGGGA-3'), na posição N+3 do sítio de mutação P106, criando um sítio de restrição para a enzima Sau96I (G<sup>A</sup>GNCC), na sequência selvagem. Qualquer mutação resultante da substituição da Pro-106 aboliria o sítio de restrição. Assim, o par de primers Sau96IF e EleuSPSPSr foi usado para amplificar um fragmento de 233 pares de bases, a ser digerido com a enzima Sau96I. O genótipo selvagem (WT) produziria, assim, uma simples banda digerida de 202 pares de bases, enquanto genótipos mutantes resistentes no alelo 106 produziram uma banda não digerida de 233 pares de bases. Sequências heterozigóticas na posição 106 deveriam produzir ambas as bandas, de 202 e 233 pares de bases (destaca-se que estas não foram encontradas). As condições usadas na PCR foram as mesmas das supracitadas, exceto pela temperatura de anelamento, que foi de 62°C. As digestões de restrição foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante (New EnglandoBioLabs), e os padrões de digestão, visualizados em gel de agarose s 2% (eletroforese em 120 V por 90 minutos), corado com brometo de etídio. A precisão dos marcadores foi confirmada comparando-se os resultados obtidos pelo sequenciamento e pelos marcadores por mais de 40 vezes.