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

Resistência múltipla de capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica*) aos inibidores da
ACCase e EPSPS no Brasil

Lucas da Silva Araújo

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2021

Lucas da Silva Araújo
Engenheiro Agrônomo

Resistência múltipla de capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica*) aos inibidores da ACCase e
EPSPS no Brasil

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO VICTORIA FILHO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2021

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

Araújo, Lucas da Silva

Resistência múltipla de capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica*) aos inibidores da ACCase e EPSPS / Lucas da Silva Araújo - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

65 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Dose-resposta 2. Mecanismo de resistência 3. Mutação 4. Desintoxicação de glifosato I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Edson José de Araújo e Maria da Glória Cordeiro da Silva Araújo, meu irmão Matheus da Silva Araújo, minha querida esposa Jordana Alves da Silva Branquinho e ao meu precioso filho Bernardo da Silva Araújo, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço eternamente a Deus pelo dom precioso da vida e as oportunidades que foram me dadas, que contribuíram para o meu crescimento pessoal, acadêmico e profissional.

Aos meus pais Edson e Maria, pelo amor e pela dedicação na minha educação, pessoas muito especiais que sempre incentivaram os meus estudos na Agronomia. Ao meu querido irmão e amigo Matheus pelo apoio e amizade incondicional, ao qual tem seguido também meus passos na pós-graduação. A toda minha família, meus avós, tios e primos, que foram e sempre serão especiais para mim mesmo à distância.

A minha querida esposa Jordana, que desde os tempos de graduação tem caminhado comigo de mãos dadas, sonhando os meus sonhos. Lembro-me o quanto você me incentivou nessa caminhada de doutorado, dividimos muitas alegrias e tristezas, o choro foi inevitável durante o percurso, porém sempre estive ao meu lado para me apoiar emocionalmente e não desistir, esta vitória também é sua, te amo meu amor.

Bernardo, meu filho amado, não foi fácil ser pai e cursar o doutorado, foi tudo novo para mim e sem dúvida um grande desafio conciliar a família e o profissional, mas hoje vejo o quanto valeu a pena e agradeço a Deus pela sua vida tão preciosa, papai te ama muito.

Agradeço a pesquisadora Dr. Nubia Maria Correia por ter me mostrando em 2016 a grandiosidade da área de plantas daninhas, na ocasião conversamos sobre a possibilidade de cursar o doutorado focado em plantas daninhas, em faculdades renomeadas do estado de São Paulo, sem dúvida esta conversa mudou rumo da minha vida porque naquele mesmo ano aquilo que parecia impossível para um estudante do interior de Goiás tornou-se realidade com a aprovação no curso de doutorado em Fitotecnia na ESALQ/USP. Nubia você fez parte dessa conquista e do meu desenvolvimento acadêmico e profissional, contribuiu fortemente para elaboração desta tese, dedicou seu tempo para colaborar com trabalho, buscou auxílios financeiros para custear a realização das análises em vários laboratórios, além de financiar uma bolsa nos meses posteriores ao término do meu contrato de bolsa do doutorado. Meu agradecimento a você é sincero e eterno.

Agradeço ao meu orientador Prof. Ricardo Victoria Filho, pelos conhecimentos transmitidos, pelo apoio, confiança e amizade. Foi uma experiência fantástica ter conviado esses anos com senhor, um grande nome na área de Planta Daninha, com conversas amistosas e de muito respeito, admiro o senhor pela força e dedicação na carreira de professor, realmente um exemplo para mim, meu eterno e sincero obrigado.

Agradeço imensamente aos professores e pesquisadores Carlos Alberto Labate e Mônica Teresa Veneziano Labate do Laboratório Max Feffer ESALQ/USP, Valdemar Luiz Tornisielo do Laboratório de Ecotoxicologia CENA/USP, Tsai Siu Mui e Danielle Gregorio Gomes Caldas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular CENA/USP e Caio Antonio Carbonari e Edivaldo Domingues Velini, pela forte contribuição com os estudos moleculares e bioquímicos, uma parceria de grande aprendizado.

Agradeço a esta instituição de ensino e a seus colaboradores, às secretárias Angela Marcia Derigi Silva, Maria Célia Rodrigues e Elisabete Sarkis São João e aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal: Aparecido D. Serrano, Luiz Ferrari, Antônio Carlos Franco, Clayton Coratito.

Agradeço também ao grupo Pro Hort e todos os seus membros, aos amigos da pós-graduação, André, Ana Ligia, Gustavo, Felipe, Luísa, Ana, Beatriz, Luis e Fernando, foi um prazer enorme aprender e poder compartilhar minhas experiências com vocês.

Agradeço ao Comitê de Ação a Resistência aos Herbicidas – HRAC pelo apoio financeiro no desenvolvimento do projeto.

Agradeço ainda a Conselho Nacional de Pesquisa (CNPQ) pela concessão da bolsa.

EPIGRAFE

“Jamais desista das pessoas que ama. Jamais desista de ser feliz. Lute sempre pelos seus sonhos. Seja profundamente apaixonado pela vida. Pois a vida é um espetáculo imperdível.”.

Augusto Cury

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
Referências	13
2. CONFIRMAÇÃO DA RESISTÊNCIA MÚLTIPLA DE CAPIM-PÉ-DE-GALINHA AOS INIBIDORES DA ACCASE E EPSPS	15
RESUMO	15
ABSTRACT	15
2.1. Introdução	16
2.2. Material e métodos.....	17
2.2.1. Materiais vegetais e condições de crescimento	17
2.2.2. Experimentos de dose-resposta	18
2.2.3. Análise de controle visual	19
2.2.4. Análise de massa seca das plantas.....	19
2.2.5. Análises estatísticas	19
2.3. Resultados e Discussão.....	19
2.3.1. Resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ACCase.....	19
2.3.2. Resistência ao glyphosate (inibidor da EPSPs)	25
2.4. Conclusões	28
Referências	28
3. MECANISMOS TARGET-SITE DA RESISTÊNCIA MÚLTIPLA DE <i>Eleusine indica</i> AOS INIBIDORES DA ACCASE E EPSPS	31
RESUMO	31
ABSTRACT	31
3.1. Introdução	32
3.2. Material e métodos.....	34
3.2.1. Materiais vegetais e condições de crescimentos.....	34
3.2.2. Sequenciamento dos genes ACCase e EPSPS por padrão PCR.....	34
3.2.3. Análise do número de cópias e expressão dos genes ACCase e EPSPS via qPCR.....	35
3.3. Resultados e discussão	37

3.3.1. Sequenciamento e expressão do gene ACCase em populações suscetível e resistente de <i>E. indica</i>	37
3.3.2. Sequenciamento e expressão do gene EPSPS em populações suscetível e resistente de <i>E. indica</i>	41
3.4. Conclusões.....	43
Referências.....	43
4. MECANISMOS NON-TARGET-SITE DA RESISTÊNCIA MÚLTIPLA DE <i>Eleusine indica</i> AOS INIBIDORES DA ACCASE E EPSPS.....	47
RESUMO	47
ABSTRACT.....	47
4.1. Introdução.....	48
4.2. Material e métodos	50
4.2.1. Materiais vegetais e condições de crescimento.....	50
4.2.2. Absorção e translocação de ^{14}C -glyphosate e ^{14}C -fenoxaprop	50
4.2.3. Efeito da inibição monooxigenases do citocromo P450	51
4.2.4. Metabolismo de glyphosate	52
4.3. Resultados e discussão	53
4.3.1. Absorção e translocação de ^{14}C -glyphosate e ^{14}C -fenoxaprop-p-ethyl	53
4.3.2. Efeito da inibição monooxigenases do citocromo P450	57
4.3.3. Perfil metabólico de <i>E. indica</i> suscetível e resistentes ao glyphosate.....	59
4.4. Conclusão	61
Referências.....	61
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65

RESUMO

Resistência múltipla de capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica*) aos inibidores da ACCase e EPSPS no Brasil

A partir de uma população de capim-pé-de-galinha de Primavera do Leste, Mato Grosso, Brasil, com resistência a múltiplos modos de ação de herbicidas (inibidores da ACCase e EPSPS), foi desenvolvido o presente estudo, para avaliar os possíveis mecanismos de resistências relacionados ou não aos sítios de ação dos herbicidas. Diversos experimentos e análises foram realizados, com a colaboração de diferentes laboratórios e instituições. Os resultados obtidos permitiram concluir que: (i) a mutação Asp2078Gly conferiu resistência aos inibidores da ACCase, sem superexpressão ACCase e, ou alterações na absorção e translocação dos herbicidas; (ii) a superexpressão EPSPs, as mutações Thr102 e P106 e alterações na absorção e translocação não estão envolvidas na resistência de capim-pé-de-galinha ao glyphosate; (iii) o metabolismo do glyphosate nas plantas de capim-pé-de-galinha resistentes merece novos estudos para elucidar o destino final do herbicida nas plantas. Enfim, o mecanismo de resistência dos biótipos de capim-pé-de-galinha aos herbicidas inibidores de ACCase foi esclarecido, e trata-se de alteração no sítio de ação. Porém, o mecanismo de resistência aos inibidores da EPSPs não foi conclusivo, permanecendo algumas hipóteses que deverão ser testadas, sobretudo em relação aos mecanismos *non-target-site resistance* para o glyphosate nas plantas resistentes.

Palavras-chave: Dose-resposta, Mecanismo de resistência, Glifosato, Ariloxifenoxipropionato, Ciclohexanodiona

ABSTRACT

Multiple resistance of goosegrass (*Eleusine indica*) to ACCase and EPSPS inhibitors in Brazil

From a population of goosegrass in Primavera do Leste, Mato Grosso, Brazil, with resistance to multiple modes of action of herbicides (ACCase and EPSPS inhibitors), the present study was developed to evaluate the possible resistance mechanisms related or not to the sites of action of the herbicides. Several experiments and analyzes were carried out, with the collaboration of different laboratories and institutions. The results obtained allowed to conclude that: (i) the Asp2078Gly mutation conferred resistance to ACCase inhibitors, without ACCase overexpression and, or changes in the absorption and translocation of the herbicides; (ii) EPSPs overexpression, Thr102 and P106 mutations and alterations in absorption and translocation are not involved in the resistance of goosegrass to glyphosate; (iii) the glyphosate metabolism in resistant goosegrass plants deserves further studies to elucidate the final destination of the herbicide in the plants. Finally, the mechanism of resistance of goosegrass biotypes to ACCase-inhibiting herbicides has been clarified, and this is a change in the site of action. However, the mechanism of resistance to EPSPs inhibitors was not conclusive, and some hypotheses remain that should be tested, especially in relation to the non-target-site resistance mechanisms for glyphosate in resistant plants.

Keywords: Dose-response, Resistance mechanism, Glyphosate, Aryloxyphenoxypropionate, Cyclohexanedione

1. INTRODUÇÃO

A resistência a herbicidas constituiu um grande desafio atual para o manejo de plantas daninhas, inclusive no Brasil. Até o momento, foram reportados 54 casos de resistência a herbicidas (Heap 2021). Dentre as espécies com problemas de resistência a herbicidas, destaca-se o capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica* L.) com três relatos oficiais de resistência aos herbicidas, envolvendo dois mecanismos de ação, os inibidores da enzima acetil-CoA carboxilase (ACCase), o grupo A, e inibidores da enzima 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase (EPSPS), o Grupo G.

E. indica é nativa do continente asiático, entretanto a espécie espalhou para a maioria das regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo (Mueller et al., 2011). No Brasil, a espécie foi considerada a planta daninha mais importante em 42% dos campos agrícolas visitados em todo o país (LUCIO et al., 2019). Em condições de flutuação térmica no solo as sementes de *E. indica* atingiram 80% de germinação aos 12 dias após a semeadura; iniciam o perfilhamento aos nove dias da emergência (DAE), há intenso perfilhamento e acúmulo de matéria seca entre 38 e 43 DAE; a máxima área foliar ocorre aos 71 DAE; produz 120.000 sementes aos 108 DAE; e termina o ciclo de vida aos 120 DAE (Takano et al., 2016).

O ciclo anual, o crescimento e o desenvolvimento rápido combinado à elevada capacidade de produção de sementes, fazem dessa espécie importante invasora em áreas de produção de grãos no Brasil (Ulguim et al., 2013). Além disso, com a evolução da resistência a herbicidas é provável que ocorram maiores perdas no rendimento das culturas e aumento no custo de produção para o controle dessa espécie.

A resistência é definida como a capacidade herdável de alguns biótipos, dentro de uma determinada população, de sobreviver e se reproduzir após a exposição à dose de um herbicida, que normalmente seria letal a uma população normal (suscetível) da mesma espécie (Christoffoleti & López-Ovejero, 2008). Para o capim-pé-de-galinha, o aumento de casos de resistência no Brasil é relacionado à intensa pressão de seleção imposta pelo uso repetitivo de herbicidas, principal opção de controle para a espécie. Em algumas situações, têm-se constatado a ineficácia dos inibidores da ACCase e glyphosate, o que torna o controle da espécie um grande desafio, pois são as principais opções de controle em pós-emergência na cultura da soja tolerante ao glyphosate.

Como capim-pé-de-galinha é uma espécie cosmopolita, torna-se propenso à seleção de resistência em todo o mundo há registro de 37 casos de resistência a herbicidas, com os seguintes mecanismos de ação (em ordem cronológica de detecção): inibidores de

microtúbulos (1973), inibidores de ALS (1989), inibidores de ACCase (1990), inibidores do Fotossistema I (1990), inibidores de EPSPS (1997), inibidores do Fotossistema II (2003) e inibidores da Protox (2015). Vale destacar que a espécie também possui dois casos de resistência cruzada aos inibidores de microtúbulos (1988) e ACCase (1990); três casos de resistência múltipla a dois mecanismos de ação, inibidores da ACCase e EPSPS (1997 e 2017), inibidores da Glutamina sintase e Fotossistema I (2009) e inibidores da EPSPS e Fotossistema I (2012); e por fim, um único caso de resistência múltipla a quatro mecanismos de ação, inibidores da ACCase, Fotossistema I, EPSPS e Glutamina sintase (2009) (Heap 2021).

A maioria dos casos de resistência na *E. indica* relataram problemas com o herbicida glyphosate. Os mecanismos de resistência ao glyphosate normalmente estão relacionados ao sítio de ação, inclusive para o capim-pé-de-galinha resistente no Brasil (Takano et al., 2017). A principal alteração do aminoácido prolina na posição 106 por serina (Pro106Ser) foi reportada mundialmente por conferir resistência ao glyphosate (Baerson et al. 2002; Kaundun et al. 2008; Takano et al., 2018). Casos mais raros, uma dupla mutação Thr102Ile e Pro106Ser também foi documentado por conferir alto nível de resistência ao glyphosate (Yu et al., 2015). A amplificação gênica da EPSPS foi relatada como importante mecanismo de resistência ao glyphosate para a espécie *E. indica* (Chen et al., 2015). Por outro lado, mecanismos não relacionados ao sítio de ação não foram documentados para a espécie.

Os mecanismos de resistência que *E. indica* evoluiu para conferir resistência aos inibidores da enzima ACCase, revelam que a mutação no sítio de ação, por exemplo a alteração de uma asparagina na posição 2078 por glicina (Asp2078Gly) constituiu em importante base molecular da resistência cruzada às duas classes químicas, ariloxifenoxipropanoatos (FOPs), ciclohexanodionas (DIMs) documentadas em populações do continente americano (Osuna et al. 2012; McCullough et al. 2016). Populações do continente asiático evoluíram outra mutação, alterando o triptofano na posição 2027 por cisteína (Trp2027Cys), causando resistência especialmente ao grupo químico FOP. Dentre os mecanismos não relacionado ao sítio de ação, a metabolização é capaz de conferir resistência aos inibidores da ACCase em *E. indica* (Wang et al., 2017).

A partir de uma população de capim-pé-de-galinha de Primavera do Leste, MT, com resistência a múltiplos herbicidas inibidores da ACCase e EPSPS, foi desenvolvido o presente estudo, para avaliar os possíveis mecanismos de resistências relacionados ou não aos sítios de ação dos herbicidas.

Referências

- Baerson S.R. et al. (2002) Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiology*, 129:1265-75.
- Chen J. et al. (2015) Mutations and amplification of EPSPS gene confer resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*). *Planta*, 242:859-68.
- Christoffoleti P.J., López-Ovejero R.F. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. In: Christoffoleti P.J., editor. *Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas*. 3ª. ed. Piracicaba: HRAC-BR, 2008. p.3-30.
- Heap I. International survey of herbicide resistant weeds. [acessado em: 27 de abril de 2021] Disponível em: <<http://www.weedscience.org/default.aspx>>.
- Kaundun S.S. et al. (2008) Importance of the P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in a goosegrass (*Eleusine indica*) population from the Philippines. *Weed Science*, 56:637-46.
- Kissmann K.G., Groth D. *Plantas infestantes e nocivas*. 2ª. ed. São Paulo: BASF, 1997.
- Lucio F.R. et al. (2019) Dispersal and frequency of glyphosate-resistant and glyphosate-tolerant weeds in soybean-producing edaphoclimatic microregions in Brazil. *Weed Technology*. 33: 217-231.
- McCullough P.E. et al. (2016) First report of ACCase-resistant Goosegrass (*Eleusine indica*) in the United States. *Weed Science*, 64:399-408.
- Mueller T.C. et al. (2011) Glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) confirmed in Tennessee. *Weed Science*, 59:562-6.
- Osuna M.D. et al. (2012) Resistance to ACCase inhibitors in *Eleusine indica* from Brazil involves a target site mutation. *Planta Daninha*, 30: 675-681.
- Takano H.K. et al. (2016) Growth, development and seed production of goosegrass. *Planta Daninha*, 34:249-58.
- Takano H.K. et al. (2017) Goosegrass resistant to glyphosate in Brazil. *Planta Daninha*, 35:1-9.
- Takano, H. K. et al. (2018). Proline-106 EPSPS Mutation imparting glyphosate resistance in goosegrass (*Eleusine indica*) emerges in South America. *Weed Science*, 67:48-56.
- Ulguim A.R. et al. (2013) Manejo de capim-pé-de-galinha em lavouras de soja transgênica resistente ao glifosato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48:17-24.
- Wang C.S. et al. (2017) Metabolism of fluazifop-p-butyl in resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in Taiwan. *Weed Science*, 65:228-238
- Yu Q. et al. (2015) Evolution of a double amino acid substitution in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Eleusine indica* conferring high-level glyphosate resistance. *Plant Physiology*, 167:1440-7.

2. CONFIRMAÇÃO DA RESISTÊNCIA MÚLTIPLA DE CAPIM-PÉ-DE-GALINHA AOS INIBIDORES DA ACCASE E EPSPS

RESUMO

O glyphosate e os herbicidas inibidores da ACCase tem sido as principais opções para o controle químico de capim-pé-de-galinha, uma espécie problemática e amplamente disseminada no Brasil. O objetivo do trabalho foi confirmar a resistência múltipla de capim-pé-de-galinha a EPSPs e ACCase. A partir de duas gerações (F1 e F2) de uma população com suspeita de resistência a glyphosate, haloxyfop e fenoxaprop, experimentos de curva dose-resposta foram conduzidos em casa-de-vegetação para cada herbicida além de fluazifop e sethoxydim. Neste estudo, as plantas tinham quatro folhas antes da aplicação dos herbicidas. Outro experimento de dose-resposta foi realizado para caracterizar o nível de resistência em plantas maiores com três perfilhos e optou-se por fenoxaprop, haloxyfop e glyphosate. Os fatores de resistência (razão R / S) obtido pela dose que fornece 50% de controle visual (ED₅₀) e redução da massa seca (GR₅₀), indicaram que a população R-F1 e geração R-F2 foram resistentes ao fenoxaprop, haloxyfop, fluazifop e sethoxydim. A dose de campo de glyphosate também não controlou a população R-F1 e R-F2 no estágio de quatro folhas com FR entre 3 e 4. A população R-F1 e geração R-F2 no estágio de três perfilhos mostraram maiores níveis de resistência aos herbicidas, com FR > 253, >18 e 11 para fenoxaprop, haloxyfop e glyphosate, respectivamente. A população de Primavera do Leste - MT é um caso de resistência múltipla aos inibidores da EPSPs (glyphosate) e ACCase (FOP e DIM), mas suscetíveis a clethodim, terpaloxymid, quizalofop-ethyl e quizalofop-tefuryl.

Palavras-chave: *Eleusine indica*; dose-resposta; fator de resistência; populações resistentes

ABSTRACT

Glyphosate and ACCase herbicide inhibitors have been the main options for the chemical control of goosegrass, a problematic species and widely disseminated in Brazil. The aim of the work was to confirm the multiple resistance of goosegrass to the EPSPs and ACCase. From two generations (F1 and F2) of a population suspected of resistance to glyphosate, haloxyfop and fenoxaprop, dose-response curve experiments were conducted in a greenhouse for each herbicide in addition to fluazifop and sethoxydim. In this study, the plants had four leaves before the herbicides were sprayed. Another dose-response experiment was carried out to characterize the level of resistance in adult plants with three tillers and fenoxaprop, haloxyfop and glyphosate were chosen. The resistance factors (R / S ratio) award for the dose that provides 50% visual control (ED₅₀) and reduction in dry mass (GR₅₀), indicated that an R-F1 population and an R-F2 generation were resistant to fenoxaprop, haloxyfop, fluazifop and sethoxydim. In addition, the field dose of glyphosate did not control the

population R-F₁ and R-F₂ in the four-leaf stage with RF between 3 and 4. The population R-F₁ and generation R-F₂ in the stage of three tillers showed high levels of resistance to herbicides, with FR > 253, > 18 and 11 for fenoxaprop, haloxyfop and glyphosate, respectively. The population of Primavera do Leste - MT is a case of multiple resistance to EPSPs (glyphosate) and ACCase (FOP and DIM) inhibitors, however, susceptible to cletodim, tepraloxym, quizalofop-ethyl and quizalofop-tefuryl.

Keywords: *Eleusine indica*; dose-response; resistance factor; resistant populations

2.1. Introdução

A pressão de seleção imposta pelo uso repetitivo de um mesmo herbicida ou mecanismo de ação, naturalmente, provoca a seleção da resistência em plantas daninhas. Dos 54 casos de resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil, mais de um terço (41%) foram de espécies da família Poaceae (Heap, 2021).

A espécie *Eleusine indica* (L.) Gaertn conhecida como capim-pé-de-galinha é um caso de gramínea resistente a herbicidas importantes para manter seu controle dentro das culturas agrícolas. Por exemplo, no Brasil foram encontradas populações resistentes aos inibidores da enzima acetil-CoA carboxilase (ACCase), o Grupo A, e outras resistentes aos inibidores da 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), o Grupo G (Osuna et al., 2012; Takano et al., 2017).

Além do Brasil, existem mais 34 relatos de resistência dessa espécie em várias regiões do mundo, relacionados a sete mecanismos de ação diferentes (Heap, 2021). O caso mais importante trata-se da resistência ao glyphosate em 11 relatos, somado a mais 20 casos de resistência a vários outros mecanismos de ação e seis casos de resistência múltipla, incluindo uma população que evoluiu resistência a quatro mecanismos de ação simultaneamente (Jalaludin et al., 2014).

O primeiro caso de capim-pé-de-galinha com resistência a herbicidas no Brasil foi reportado para os inibidores da ACCase em lavoura de soja em Mato Grosso no início dos anos 2000 (Heap, 2021). Essa resistência aos inibidores da ACCase foi confirmada para os grupos químicos ariloxifenoxipropionatos (FOPs) e ciclohexanodionas (DIMs) (Vidal et al., 2006). Mais tarde, o mecanismo de resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ACCase foi esclarecido em *E. indica*, uma mutação no sítio de ação através da substituição do aminoácido asparagina por glicina na posição 2078 (Asp2078Gly) (Osuna et al., 2012).

Naquela época, a evolução da resistência foi impulsionada pela pressão de seleção exercida pelo uso generalizado dos herbicidas inibidores da ACCase, que antes da introdução soja resistente ao glyphosate (GR) era a principal opção química capaz de controlar plantas daninhas poáceas em pós-emergência da cultura. Com avanço da comercialização da soja GR, o glyphosate substituiu os inibidores da ACCase em pós-emergência, fornecendo um amplo espectro de controle de plantas daninhas.

As cultivares GR predominam em mais de 90% da área total de soja na América do Sul e o glyphosate é frequentemente aplicado de três a cinco vezes por ano nessas áreas (Peterson et al., 2018). Portanto, repetiu-se a dependência excessiva pelo método químico, resultando na evolução da resistência ao glyphosate em oito espécies do Brasil, incluindo *E. indica* (Heap, 2021).

O primeiro relato de capim-pé-de-galinha resistente ao glyphosate no Brasil foi em duas lavouras de soja nos municípios de Campo Mourão e Luziânia, centro-oeste do Paraná (Takano et al., 2017). Subsequente estudo confirmou que essa resistência ao glyphosate em *E. indica* foi atribuída a uma alteração no sítio de ação do herbicida, que envolve a substituição do aminoácido prolina por serina na posição 106 (Pro106Ser) (Takano et al., 2018).

Para agravar o problema de resistência a herbicidas na espécie *Eleusine indica*, a suspeita que uma população de Primavera do Leste, Mato Grosso evolui resistência múltipla e cruzada ao glyphosate e herbicidas inibidores da ACCase. Com este estudo, investiga-se a resistência a múltiplos modos de ação de herbicidas por meio da análise de curva de dose-resposta e determinamos o padrão de resistência cruzada aos inibidores da ACCase.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Amostras e condições de crescimento

As sementes de capim-pé-de-galinha com suspeita de resistência ao glyphosate e herbicidas inibidores da ACCase foram coletadas no município de Primavera do Leste, MT, Brasil (15° 22'32,57" latitude, 54° 26'03,53" longitude, e 631 m altitude). Na área de coleta foram cultivadas culturas anuais (soja, milho, algodão e feijão), com histórico de aplicações de glyphosate e herbicidas inibidores de ACCase para o controle de capim-pé-de-galinha. As sementes da população suscetível, utilizada como população padrão, foi proveniente de Engenheiro Coelho, SP (Empresa Agrocósmos, 22° 30'25,25" latitude; 47° 10'36,97" longitude, 660 m altitude).

As populações de capim-pé-de-galinha foram semeadas em vasos (1,2 dm³ de volume) contendo solo de textura argilosa previamente adubado com 575 mg de N, 500 mg P₂O₅ e 500 mg K₂O por dm³ de solo. Após a emergência, as plantas foram desbastadas para manter três plantas por vaso. Cada vaso (unidade experimental) foi colocado sobre um vasilhame de maior diâmetro e sem orifícios para o suprimento hídrico das plantas. A umidade do solo foi controlada periodicamente, repondo-se a água nos vasilhames sempre que necessário. As temperaturas mínima e máxima foram 18 e 30 °C; umidade relativa média de 76% sob iluminação natural.

2.2.2. Experimentos de dose-resposta

O estudo foi conduzido na casa-de-vegetação do Departamento de Fitotecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” em Piracicaba, São Paulo (22°42'30"S, 47°38'0"W e 546 m de altitude). Os experimentos foram organizados no delineamento inteiramente casualizado e com três repetições. Os experimentos de dose-resposta foram realizados com a população suscetível (S) e a população supostamente resistente R-F₁ coletadas do campo e a geração R-F₂ obtida a partir da população F₁.

Quando as plantas tinham quatro folhas totalmente expandidas, elas foram tratadas com herbicidas inibidores da ACCase, [fenoxaprop (110 g i.a. ha⁻¹), fluazifop (125 g i.a. ha⁻¹), haloxyfop (60 g e.a. ha⁻¹), sethoxydim (184 g i.a. ha⁻¹)] e um inibidor da EPSPs [glyphosate (1000 g e.a. ha⁻¹)]. Os herbicidas foram aplicados em doses de 0, 1/32, 1/16, 1/8, 1/4, 1/2, 1, 2, 4, 8, 16, 32 vezes a dose de campo. Em outro experimento, quando as plantas tinham três perfilhos, o fenoxaprop foi aplicado com 0, 13,8, 27,5, 55, 110, 220, 440, 880, 1760, 3520 e 7040 g i.a. ha⁻¹; o haloxyfop com 0, 7,5, 15, 30, 60, 120, 240, 480, 960, 1920 e 3840 g e.a. ha⁻¹; e o glyphosate com 0, 62,5, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000, 8000, 16000 e 32000 g e.a. ha⁻¹.

Em todos os experimentos, os herbicidas foram aplicados com pulverizador manual pressurizado, equipado com uma ponta de pulverização Magno AD11002. O pulverizador foi operado com pressão de 2 kPa, fornecendo volume equivalente a 200 L ha⁻¹. As plantas foram devolvidas para casa-de-vegetação após a aplicação dos herbicidas, e a irrigação foi suspensa por 24 horas.

2.2.3. Avaliação de controle visual

A avaliação visual de controle plantas daninhas foram realizadas em uma escala de 0 a 100% aos 21 DAA para o estágio de quatro folhas e aos 35 dias para o estágio de três perfilhos. A nota de 0% significa a ausência de controle e 100% a destruição total das plantas (Frans et al., 1986).

2.2.4. Avaliação de massa seca das plantas

Nas mesmas épocas de avaliação de controle visual foi determinado a massa seca da parte aérea, coletando-se apenas tecidos da parte aérea que sobreviveu a aplicação. O material vegetal foi seco em uma estufa a 65 °C, até atingir massa constante.

2.2.5. Análises estatísticas

Os dados de controle e massa seca relativa (% não tratado) foram submetidos a um modelo de regressão logística de três parâmetros usando o pacote drc do software R (Ritz et al., 2015):

$$y = \frac{a}{\left[1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b\right]}$$

Nessa equação, y pode ser controle ou massa seca, x é dose de herbicida (g i.a. / e.a. ha⁻¹), a representa o valor máximo, c é a dose letal para causar 50% de lesão (ED₅₀) e b é a declividade da curva em torno de b . O fator de resistência (FR) foi estimado por ED₅₀ resistente/ ED₅₀ suscetível (Burgos et al., 2013).

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ACCase

Os experimentos de dose-resposta no estágio de quatro folhas mostraram que a população resistente (R-FI) exibe diferentes níveis de fator de resistência (FR) aos herbicidas inibidores da ACCase, enquanto todos os herbicidas testados controlaram a população suscetível (S) em suas respectivas doses (Tabela 1 e 2).

Tabela 1. Parâmetros das equações de regressão, doses estimadas que fornece 50 e 90% de controle (ED) e fator de resistência (FR) de populações suscetível (S) e resistente (R-F₁ e R-F₂) de *Eleusine indica* aos herbicidas inibidores da ACCase. – Estádio de aplicação de quatro folhas.

Herbicida	População	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i> (ED ₅₀ , g ha ⁻¹)	ED ₉₀ (g ha ⁻¹)	FR
Fenoxaprop	S	100,71	-0,74	0,98	19,28	-
	R-F ₁	113,72	-1,27	635,30	3604,18	650,0
	R-F ₂	120,36	-0,90	531,52	6040,61	543,8
Fluazifop	S	100,95	-2,56	23,19	54,74	-
	R-F ₁	99,96	-7,05	211,25	288,46	9,1
	R-F ₂	100,54	-6,15	271,96	388,77	11,7
Haloxifop	S	NA	NA	<1,88	<1,88	-
	R-F ₁	103,44	-1,72	44,79	160,71	>23,8
	R-F ₂	101,00	-3,14	48,17	97,05	>25,6
Sethoxydim	S	101,27	-2,86	23,36	50,39	
	R-F ₁	103,18	-2,11	302,54	856,31	12,9
	R-F ₂	101,12	-2,93	249,89	529,61	10,7

FR: calculado pela razão de ED₅₀ R-F₁ ou R-F₂ / ED₅₀ S. Ajuste do modelo: $y = a / [1 + (x / b)^c]$. ED₅₀ e ED₉₀: dose letal que fornece 50 e 90% de controle, respectivamente. NA: modelo não ajustado.

A população R-F₁ evoluiu resistência a quatro herbicidas, sendo três deles do grupo químico FOP e outro do DIM. Com base no controle visual (ED₅₀), a população R-F₁ tinha alto nível de resistência ao fenoxaprop (FR = 650 vezes), enquanto os FRs foram aproximadamente 24, 9 e 13 vezes para haloxifop, fluazifop e sethoxydim, respectivamente. Baseado nos valores de massa seca (GR₅₀), também foi caracterizado alto nível de resistência a fenoxaprop (FR = 344 vezes), além da resistência aos demais herbicidas como haloxifop (FR = 34 vezes), fluazifop (FR = 7 vezes) e sethoxydim (FR = 12 vezes).

Para o controle eficiente da população R-F₁, a dose estimada dos herbicidas que fornece 90% de controle ou redução da massa seca (ED₉₀ e GR₉₀), seguramente excedeu a dose recomendada no campo. Por exemplo, o aumento de pelo menos 17 vezes a dose de campo do fenoxaprop (110 g i.a. ha⁻¹) foi exigido para o controle da população R-F₁. Em outros casos o aumento foi de 2 a 4 vezes a dose recomendada de fluazifop (125 g i.a. ha⁻¹), haloxifop (60 g e.a. ha⁻¹) e sethoxydim (184 g i.a. ha⁻¹).

Tabela 2. Parâmetros das equações de regressão, doses estimadas que fornece 50 e 90% de redução de matéria seca (GR) e fator de resistência (FR) de populações suscetível (S) e resistente (R-F1 e R-F2) de *Eleusine indica* aos herbicidas inibidores da ACCase. – Estádio de aplicação de quatro folhas.

Herbicida	População	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i> (GR ₅₀ , g ha ⁻¹)	GR ₉₀ (g ha ⁻¹)	FR
Fenoxaprop	S	100,06	0,95	1,24	12,51	-
	R-F1	96,46	1,50	427,53	1846,92	344,3
	R-F2	112,38	1,10	303,22	2208,40	244,2
Fluazifop	S	98,71	14,46	32,79	38,17	-
	R-F1	108,41	19,95	241,68	269,82	7,4
	R-F2	88,29	12,13	277,46	332,56	8,5
Haloxifop	S	NA	NA	<1,88	<1,88	-
	R-F1	101,94	9,97	62,91	78,43	>33,5
	R-F2	112,27	15,93	58,15	66,74	>30,9
Sethoxydim	S	89,30	6,42	25,91	36,47	-
	R-F1	83,61	2,48	305,16	739,70	11,8
	R-F2	86,41	5,73	302,66	444,26	11,7

FR: calculado pela razão de ED₅₀ R-F1 ou R-F2 / ED₅₀ S. Ajuste do modelo: $y = a / [1 + (x / b)^c]$. ED₅₀ e ED₈₀: dose letal que fornece 50 e 80% de controle, respectivamente. NA: modelo não ajustado.

A geração R-F2 mostrou o mesmo padrão de resposta observado para população R-F1, maior nível de resistência para fenoxaprop (FR = 544 e 244), haloxifop (FR = 26 e 31), sethoxydim (FR = 11 e 12) e fluazifop (FR = 12 e 9), com base nos dados de ED₅₀ e GR₅₀, respectivamente. A dose de campo dos herbicidas não é mais suficiente para o controle efetivo (ED₉₀ e GR₉₀) da geração R-F2, o que está de acordo com os dados da população R-F1. Esses resultados confirmam precisamente a resistência cruzada aos inibidores da ACCase (FOP e DIM) na população de Primavera do Leste-MT, herdada em gerações subsequentes das plantas coletados no campo (Figura 1).

Figura 1. População de Primavera do Leste-MT com resistência cruzada a FOP e DIM. Estádio de aplicação de quatro folhas. Piracicaba, São Paulo, 2021.

Dentre os inibidores da ACCase testados, optou-se por avaliar fenoxaprop e haloxyfop no estágio de três perfilhos. Neste estágio de crescimento observou-se que a dose mais alta de fenoxaprop ($7040 \text{ i.a. ha}^{-1}$) não foi suficiente para fornecer ED_{50} e GR_{50} da população R_{-F1} e geração R_{-F2} , sugerindo um FR maior que $>253,2$ e $>362,9$ vezes, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Variáveis Parâmetros das equações de regressão, doses estimadas que fornece 50 e 90% de controle (ED) e redução de matéria seca (GR) e fator de resistência (FR) de populações suscetível (S) e resistente (R-F₁ e R-F₂) de *Eleusine indica* aos herbicidas inibidores da ACCase. – Estádio de aplicação de três perfilhos.

Herbicida	População	<i>a</i>	<i>b</i>	GR ₅₀ (g ha ⁻¹)	GR ₉₀ (g ha ⁻¹)	FR
Controle (%)						
Fenoxaprop	S	100,0	-5,5	27,8	41,6	
	R-F ₁	NA	NA	>7040	>7040	>253,2
	R-F ₂	NA	NA	>7040	>7040	>253,2
Haloxypop	S	NA	NA	<15	<15	
	R-F ₁	-1,62	92,85	272,9	1055,5	>18,2
	R-F ₂	-1,70	94,68	317,9	1157,7	>21,2
Matéria seca (%)						
Fenoxaprop	S	99,9	3,5	19,4	36,54	
	R-F ₁	NA	NA	>7040	>7040	>362,9
	R-F ₂	NA	NA	>7040	>7040	>362,9
Haloxypop	S	NA	NA	<15	<15	
	R-F ₁	1,1	101,0	332,7	2424,4	>22,2
	R-F ₂	1,3	96,6	324,8	1695,5	>21,7

FR: calculado pela razão de ED₅₀ R-F₁ ou R-F₂ / ED₅₀ S. Ajuste do modelo: $y = a / [1 + (x / b)^c]$. ED₅₀ e ED₈₀: dose letal que fornece 50 e 80% de controle, respectivamente. NA: modelo não ajustado.

Com relação ao haloxypop, a população R-F₁ e geração R-F₂ tiveram valores de ED₅₀ de 272,9 e 317,9 g e.a. ha⁻¹, respectivamente. As doses de GR₅₀ foi de 332,7 e 324,8 g e.a. ha⁻¹ para população R-F₁ e geração R-F₂, respectivamente. Considerando as doses de ED₉₀ e GR₉₀, a população R-F₁ e geração R-F₂ podem ser considerados altamente resistentes aos dois herbicidas fenoxaprop e haloxypop (Figura 2).

Figura 2. População de Primavera do Leste-MT mostra altos níveis de resistência a fenoxaprop-p-ethyl e haloxyfop-p-methyl. Estádio de aplicação de três perfilhos. Piracicaba, São Paulo, 2021.

A resistência aos herbicidas inibidores da ACCase (Grupo A) já havia sido registrada em populações de capim-pé-de-galinha em campos de soja no estado do Mato Grosso (MT) em 2003 (Heap, 2021). Esse primeiro relato confirmou a resistência cruzada de *E. indica* aos grupos químicos FOP e DIM (Vidal et al., 2006). Posteriormente, outra população do MT também evoluiu resistência cruzada, com altos níveis de resistência para fenoxaprop (FR = 143), haloxyfop (FR = 126), sethoxydim (FR = 84) e fluazifop (FR = 58) (Osuna et al., 2012).

Os resultados deste trabalho sugerem que populações de *E. indica* provenientes de Primavera do Leste, MT, compartilham o mesmo padrão de resistência cruzada aos grupos químicos FOP e DIM como observado nos trabalhos anteriores, mas com diferenças de sensibilidade aos herbicidas. Curiosamente, esse perfil de resistência cruzada aos grupos FOP e DIM não é incomum na espécie, com relatos desde a década de 90 na Malásia e 2015 nos Estados Unidos (Marshall et al., 1994; Leach et al., 1995; McCullough et al., 2016).

O mecanismo *target-site resistance* (TSR) tem sido frequentemente relacionado a resistência contra muitos herbicidas inibidores da ACCase, com predomínio das mutações Trp2027Cys e Asp2078Gly, reportadas em populações resistentes fora do país (Cha et al., 2014; McCullough et al., 2016). No Brasil, à resistência cruzada de capim-pé-de-galinha às classes químicas FOP e DIM foi atribuída a mutação de Asp2078Gly (Osuna et al., 2010). Vale ressaltar que nesse estudo a população não foi resistente a clethodim, quizalofop-p-ethyl, quizalofop-p-tefuryl e tepraloxymid (Figura 3).

Figura 3. População de Primavera do Leste-MT ainda suscetível a clethodim, quizalofop-p-ethyl, quizalofop-p-tefuryl e tepraloxym. Estádio de aplicação de três perfilhos. Piracicaba, São Paulo, 2021.

2.3.2. Resistência ao glyphosate (inibidor da EPSPs)

Além da resistência cruzada aos herbicidas FOP e DIM, a população R-F1 e a geração R-F2 não foram controladas com a dose de 1000 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate no estágio de quatro folhas, inclusive o dobro da dose de campo também falhou em controlar as plantas resistentes no estágio de três perfilhos (Figura 4). No estágio de quatro folhas, o valor de ED₅₀ na população S foi de 143,8 g e. a. ha⁻¹, enquanto para as populações R-F1 e geração R-F2 foi de 573,4 e 522,7 g e. a. ha⁻¹, respectivamente (Tabela 4). Nestes casos, a dose recomendada não proporcionou controle eficiente das populações R-F1 e geração R-F2, que apresentaram ED₉₀ de 1521,9 e 1077 g e. a. ha⁻¹, respectivamente.

Figura 4. População de Primavera do Leste-MT com resistência ao herbicida glyphosate. Estádio de aplicação de quatro folhas e três perfilhos. Piracicaba, São Paulo, 2021.

Com base nos valores de GR_{50} , a população R_{-F1} e geração R_{-F2} tinham um FR de 3 vezes em comparação com a população S. O aumento da dose de campo foi necessário para fornecer o controle efetivo da população R_{-F1} . Apesar da geração R_{-F2} ter sobrevivido a dose de 1000 g e.a. ha^{-1} , a estimativa do GR_{90} foi de 639,4 g e.a. ha^{-1} , não atendendo o critério de resistência agrônômica. Neste caso, é importante analisar as plantas com três perfilhos, ainda considerado um estágio de suscetibilidade ao glyphosate.

Tabela 4. Parâmetros das equações de regressão, doses estimadas que fornece 50 e 80% de controle e fator de resistência (FR) de populações suscetível (S) e resistente (R-F₁ e R-F₂) de *Eleusine indica* ao glyphosate. – Estádio de aplicação de quatro folhas e três perfilhos.

Estádio	População	<i>a</i>	<i>b</i>	ED ₅₀ ou GR ₅₀ (g ha ⁻¹)	ED ₉₀ ou GR ₉₀ (g ha ⁻¹)	FR
Controle						
4 folhas	S	-2,95	100,0	143,8	303,0	
	R-F ₁	-2,25	100,7	573,4	1521,9	4,1
	R-F ₂	-3,04	99,3	522,7	1077,4	3,6
3 perfilhos	S	-5,0	100,1	194,9	303,4	
	R-F ₁	-3,1	100,2	2059,9	4212,8	10,3
	R-F ₂	-2,4	103,1	1998,9	4920,0	10,6
Matéria seca						
4 folhas	S	4,2	102,2	141,8	240,7	
	R-F ₁	2,7	104,6	475,1	1082,5	3,4
	R-F ₂	7,0	111,0	467,2	639,4	3,3
3 perfilhos	S	16,3	104,0	230,9	264,3	
	R-F ₁	5,0	101,0	2430,7	3787,6	10,5
	R-F ₂	7,1	94,5	2432,9	3321,3	10,5

FR: calculado pela razão de ED₅₀ R-F₁ ou R-F₂ / ED₅₀ S. Ajuste do modelo: $y = a / [1 + (x / b)^c]$. ED₅₀ e ED₈₀: dose letal que fornece 50 e 80% de controle, respectivamente.

Considerando os parâmetros de ED₅₀ e GR₅₀, os FRs maior que 10 confirmaram a resistência da população R-F₁ e geração R-F₂ ao glyphosate. O controle eficiente (ED₉₀ e GR₉₀) da população R-F₁ e geração R-F₂ foram obtidos aumentando-se de 3 a 4 vezes a dose de campo de glyphosate. Neste estudo, observou maiores níveis de resistência em comparação ao primeiro relato de *E. indica* resistente ao glyphosate (FR = 3,9 e 6,8) no Brasil (Takano et al., 2017). Em parte, o nível de resistência pode estar relacionado diretamente ao mecanismo de resistência, mas é importante considerar o momento da avaliação aos 35 DAA, que proporcionou tempo para as plantas resistentes recuperar-se e desenvolver normalmente.

Em outros países, um aumento de duas a quatro vezes a resistência ao glyphosate foram reportadas em populações dos Estados Unidos e Filipinas (Kaundun et al., 2008; Huffman et al., 2016; Molin et al., 2013); de quatro a oito vezes para populações da Malásia, China e Tennessee-EUA (Lee & Ngim, 2000; Muller et al., 2011; Chen et al., 2015); e mais de 100 vezes para uma população de Jerantut, Malásia (Yu et al., 2015), com base em ensaios de dose-resposta.

A resistência ao glyphosate em *E. indica* tem sido relacionada frequentemente aos mecanismos TSR, por mutações simples de Pro106Ser ou Pro106Tre (Baerson et al., 2002; Ng et al., 2004; Kaundun et al., 2008), dupla mutação Thr102Ile e Pro106Ser [TIPS] (Yu et al., 2015) e amplificação gênica da EPSPS (Chen et al., 2015). No Brasil, a resistência de populações de *E. indica* aos inibidores da EPSPs foram atribuídas a mutação Pro106Ser responsável pela resistência a glyphosate (Takano et al., 2018).

Portanto, neste capítulo confirmou-se um caso de resistência múltipla de *E. indica* aos inibidores da ACCase e EPSPs em uma população de Primavera do Leste, estado do Mato Grosso, Brasil. Nos capítulos subsequentes investiga os possíveis mecanismos de resistência relacionados ou não ao sítio de ação.

2.4. Conclusões

A população de capim-pé-de-galinha de Primavera do Leste - MT constituiu um caso de resistência múltipla e cruzada aos inibidores da EPSPs e ACCase.

Os herbicidas clethodim, tepraloxym, quizalofop-ethyl e quizalofop-tefuryl podem ser opções químicas para o manejo dessa população resistente.

Referências

- Amrhein, N., Schab, J. & Steinrücken, H.C. (1980) The mode of action of the herbicide glyphosate. *Naturwissenschaften*, 67:356-357.
- Baerson S.R. et al. (2002) Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiology*, 129:1265-75.
- Burgos N.R. et al. (2013) Review: confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. *Weed Science*, 61:4-20.
- Cha, T. et al. (2014) Molecular basis for resistance to ACCase-inhibiting fluazifop in *Eleusine indica* from Malaysia. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 111:7-13.
- Chen J. et al. (2015) Mutations and amplification of EPSPS gene confer resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*). *Planta*, 242:859-68.

Frans, R. et al. (1986). Experimental design and techniques for measuring and analyzing plant responses to weed control practices. In: N. D. Camper (Ed.), *Research methods in weed science* (3rd ed., pp. 29–46). Champaign, IL: Southern Weed Science Society, WSSA.

Heap I. International survey of herbicide resistant weeds. [acessado em: 27 de abril de 2021]. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/default.aspx>>.

Huffman J.L. et al. (2016) The EPSPS Pro106Ser substitution solely accounts for glyphosate resistance in a goosegrass (*Eleusine indica*) population from Tennessee, United States. *Journal of Integrative Agriculture*, 15:1304-1312.

Jalaludin, A. et al. (2014) Multiple resistance across glufosinate, glyphosate, paraquat and ACCase-inhibiting herbicides in an *Eleusine indica* population. *Weed Research.*, 55:82-9.

Kaundun S.S. et al. (2008) Importance of the P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in a goosegrass (*Eleusine indica*) population from the Philippines. *Weed Science*, 56:637-46.

Leach, G. E. et al. (1995) Target enzyme-based resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in *Eleusine indica*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 51:129-136

Lee L.J., Ngim J (2000) First report of glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica* (L) Gaertn) in Malaysia. *Pest Management Science*, 56:336-9.

Marshall, G. et al. (1994) Comparative studies on graminicide-resistant and susceptible biotypes of *Eleusine indica*. *Weed Research*, 34:177-185.

McCullough P.E. et al. (2016) First report of ACCase-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in the United States. *Weed Science*, 64:399-408.

Molin W.T. et al. (2013) Glyphosate resistant goosegrass from Mississippi. *Agronomy*, 3:474-87.

Mueller T.C. et al. (2011) Glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) confirmed in Tennessee. *Weed Science*, 59:562-6.

Ng C.H. et al. (2004) Glyphosate resistance in *Eleusine indica* (L) Gaertn from different origins and polymerase chain reaction amplification of specific alleles. *Australian Journal of Agricultural Research*, 55:407-14.

Osuna M.D. et al. (2012) Resistance to ACCase inhibitors in *Eleusine indica* from Brazil involves a target site mutation. *Planta Daninha*, 30:675-681.

- Peterson, M.A. et al. (2018) The challenge of herbicide resistance around the world: a current summary. *Pest Management Science*, 74:2246–2259.
- Ritz, C. et al. (2015) Research methods in weed science: Statistics. *Weed Science*, Special Issue:166-187.
- Takano H.K. et al. (2017) Goosegrass resistant to glyphosate in Brazil. *Planta Daninha*, 35:1-9.
- Takano H.K. et al. (2018) Proline-106 EPSPS Mutation imparting glyphosate resistance in goosegrass (*Eleusine indica*) emerges in South America. *Weed Science*, 67:48-56.
- Vidal, R. A. et al. (2006) Resistência de *Eleusine indica* aos inibidores de ACCase. *Planta Daninha*, 24:163-171.
- Wang C.S. et al. (2017) Metabolism of fluazifop-p-butyl in resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in Taiwan. *Weed Science*, 65:228-238.
- Yu Q. et al. (2015) Evolution of a double amino acid substitution in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Eleusine indica* conferring high-level glyphosate resistance. *Plant Physiology*, 167:1440-1447.

3. MECANISMOS *TARGET-SITE* DA RESISTÊNCIA MÚLTIPLA DE *Eleusine indica* AOS INIBIDORES DA ACCASE E EPSPS

RESUMO

A evolução de mutações nos sítios de ação da ACCase e EPSPS é um mecanismo de resistência comum na espécie *Eleusine indica* reportado em diferentes partes do mundo. O objetivo deste trabalho foi investigar se o mecanismo de resistência de capim-pé-de-galinha de Primavera do Leste-MT pode estar relacionado aos dois sítios de ação. A partir de cinco plantas das populações suscetível (S) e resistente (R-F₁ e geração R-F₂), o DNA foi extraído, amplificado e sequenciado por técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR). Para a ACCase, dois fragmentos A e B de aproximadamente 500 pb foram sequenciados do domínio CT da enzima, enquanto um fragmento da EPSPS de 300 pb foi sequenciado e comparado. O número de cópias e a expressão das enzimas ACCase e EPSPS foram determinadas pela técnica de PCR em tempo real. A análise de sequenciamento detectou uma mutação no gene da ACCase na posição 2078 de uma asparagina por uma glicina (Asp2078Gly) em plantas resistentes, o que está associado ao mecanismo de resistência. Em relação a EPSPS, não foi encontrada nenhuma mutação nas posições 102 e 106, locais conhecidos para o desenvolvimento de mutações contra o glyphosate. O número de cópias e a expressão das enzimas ACCase e EPSPS foram similares para as populações S e R-F₁ e geração R-F₂. Portanto, outros mecanismos de resistência, aqueles baseados fora do sítio de ação podem explicar a evolução da resistência ao glyphosate.

Palavras-chave: Asp2078Gly; resistência cruzada; enzima; PCR; amplificação gênica

ABSTRACT

Evolution of mutations at the ACCase and EPSPS sites of action is a common resistance mechanism in the *Eleusine indica*, reported with herbicide-resistant populations in different parts of the world. The aim of this work was to investigate whether the resistance mechanism of the goosegrass from Primavera do Leste-MT can be related to the two sites of action. From five plants of the susceptible (S) and resistant (R-F₁ and R-F₂ generation) populations, the DNA was extracted, amplified and sequenced by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. For ACCase, two fragments A and B of approximately 500 bp were sequenced from the CT domain of the enzyme, while a 300 bp EPSPS fragment was sequenced and compared. The number of copies and the expression of the enzymes ACCase and EPSPS were determined by the real-time PCR technique. Sequencing analysis detected mutation in the ACCase gene at position 2078 of an asparagine by a glycine (Asp2078Gly) in resistant plants, which is related with the resistance mechanism. Regarding EPSPS, no mutations were found at positions 102 and 106, known sites for the development of mutations against glyphosate.

The number of copies and the expression of the enzymes ACCase and EPSPS were similar for populations S and R-F₁ and generation R-F₂. Thus, other resistance mechanisms, those based outside the site of action, may explain glyphosate resistance evolution.

Keywords: Asp2078Gly; cross-resistance; enzyme; PCR; gene amplification

3.1. Introdução

Acetil-CoA carboxilase (ACCase), a enzima chave para síntese de ácidos graxos nas plantas exibe uma estrutura funcional terciária, formada por uma proteína transporte biotina-carboxila (BCCP), biotina carboxilase (BC) e carboxiltransferase (CT) subunidades α e β (Gornicki et al., 1994). ACCase depende da biotina para catalisar a carboxilação de acetil-CoA para produção de malonil-CoA dentro dos domínios BC e CT (Nikolau et al., 2003; Sasaki & Nagano, 2004). Nos cloroplastos, malonil-CoA tem um papel importante na elaboração de novos ácidos graxos, enquanto no citoplasma é usado para elongação de ácidos graxos de cadeia muito longa, além da produção de metabólitos secundários (Harwood, 1988).

A importância desse processo é refletida pela inibição da enzima ACCase pelo herbicida, que prejudica diretamente a biossíntese de ácidos graxos e pode ser letal para as plantas (Délye, 2005). Três classes químicas de inibidores de ACCase estão comercialmente disponíveis, ariloxifenoxipropionatos (FOPs), ciclohexanodionas (DIMs) e fenilpirazol (DENs), todos eles utilizados em todo o mundo para controlar plantas daninhas gramíneas dentro de culturas dicotiledôneas (Kaundun, 2014). A alta eficácia em pós-emergência contra várias espécies da família Poaceae pode ser explicada pela versão ACCase eucariótica nos plastídios, portanto sensível aos inibidores da ACCase (Kukorelli et al., 2013).

Com ampla adoção pelos agricultores, os inibidores da ACCase tiveram o uso frequente nos campos agrícolas e após a exposição contínua, 49 espécies evoluíram resistência aos inibidores da ACCase ao redor do mundo (Heap, 2021). Na maioria dos casos, as plantas daninhas evoluíram mecanismos de resistência relacionados ao sítio de ação, o mais comum tem sido a alteração pontual de aminoácido em diferentes regiões da interface do domínio CT da ACCase plastídica (Délye, 2005; Liu et al., 2007). Até o momento, sete alterações de aminoácidos Ile1781, Trp1999, Trp2027, Ile2041, Asp2078, Cys2088 e Gly2096 no domínio CT foram documentadas para conferir resistência cruzada em uma

coleção de plantas daninhas economicamente importantes (Beckie & Tardif, 2012; Kaundun, 2014; Powles & Yu, 2010; Takano et al., 2021).

O outro mecanismo de sítio de ação reconhecido a pouco tempo para conferir resistência aos inibidores da ACCase é o aumento da expressão da enzima, reportado na espécie *Digitaria sanguinalis*, que exige mais herbicida para alcançar um efeito letal (Laforest et al., 2017; Tranel, 2017). No caso de capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica*), as mutações em Trp2027Cys e Asp2078Gly constituem até os dias atuais a base molecular para resistência aos inibidores da ACCase em diferentes partes do mundo, incluindo países como a Malásia, Estados Unidos e Brasil (Osuna et al., 2010; Cha et al., 2014; Jalaludin & Powles, 2014; McCullough et al., 2016; Vázquez-García et al., 2021).

Outro local de ação importante para o controle de plantas daninhas, a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que catalisa a reação de conversão do chiquimato-3-fosfato e fosfoenolpiruvato em EPSP e fosfato inorgânico, na rota do ácido chiquímico (Schönbrunn et al., 2001). Em condições normais de crescimento, cerca de 35% do carbono fixado pelas plantas passa por essa rota (Frans et al., 1997), necessária para a produção de aminoácidos aromáticos, como triptofano, tirosina e fenilalanina e outros importantes metabólitos secundários (Weaver & Herrmann, 1997). O glifosato é capaz de inibir fortemente a EPSPS, o que leva ao acúmulo de ácido chiquímico e bloqueio da produção de aminoácidos aromáticos (Amrhein & Steinrücken, 1980).

Desde a sua introdução comercial em 1974, o glyphosate tornou-se o herbicida dominante em todo o mundo (Duke & Powles, 2008). Altamente eficaz, controla um amplo espectro de plantas daninhas, além de seguro do ponto de vista toxicológico e ambiental (Powles & Preston, 2006). A soja resistente ao glyphosate (GR) promoveu muito a aplicação do glifosato, por exemplo 90% dos campos de soja na América do Sul tinha variedades transgênicas e o glifosato é aplicado pelo menos três vezes ao ano (Peterson et al., 2018). O uso intensivo do glyphosate levou à seleção de 53 espécies de plantas daninhas de diferentes partes do mundo e o capim-pé-de-galinha foi reportado em 16 casos de resistência envolvendo o glyphosate (Heap, 2021).

O mecanismo de resistência de *E. indica* ao glyphosate no Brasil foi relacionado ao sítio de ação, a alteração do aminoácido Pro106Ser foi confirmada na EPSPS da população resistente (Takano et al., 2018; Vázquez-García et al., 2021). Essa mutação também foi importante mecanismo de resistência ao glifosato em populações de *E. indica* fora do país, como na Ásia e América do Norte (Baerson et al. 2002; Kaundun et al., 2008; Mueller et al., 2011). Surpreendentemente, *E. indica* pode evoluir uma dupla mutação Thr102Ile e

Pro106Ser (TIPS) no gene EPSPS para conferir alta resistência ao glyphosate (Yu et al., 2015). Outro mecanismo de resistência, a amplificação do gene EPSPS foi relatado em *E. indica* (Che et al., 2017; Deng et al., 2020), além de um caso específico envolvendo simultaneamente a mutação Pro106Ser e superexpressão da EPSPS em uma população resistente ao glyphosate (Gherekhloo et al., 2017).

A partir de uma população de capim-pé-de-galinha de Primavera do Leste, MT, com resistência múltipla a ACCase e EPSPS, foi desenvolvido o presente estudo, para avaliar os possíveis mecanismos de resistência relacionados ao sítio de ação dos herbicidas.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Materiais vegetais e condições de crescimentos

As populações suscetíveis (S) e resistentes (R-F₁ e geração R-F₂) de capim-pé-de-galinha foram semeadas em vasos (0,25 dm³ de volume) contendo solo de textura argilosa previamente adubado com 575 mg de N, 500 mg P₂O₅ e 500 mg K₂O por dm³ de solo. Durante o mês de janeiro de 2019, as plantas foram crescidas em casa-de-vegetação do Departamento de Fitotecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” em Piracicaba, São Paulo. Após a emergência, as plantas foram desbastadas para manter uma planta por vaso. Cada vaso (unidade experimental) foi colocado sobre um vasilhame de maior diâmetro e sem orifícios para o suprimento hídrico das plantas. A umidade do solo foi controlada periodicamente, repondo-se a água nos vasilhames sempre que necessário. As temperaturas mínima e máxima foram 20,4 e 33,4 °C; umidade relativa média de 79,2% sob iluminação natural.

3.2.2. Sequenciamento dos genes ACCase e EPSPS por padrão PCR

O experimento de sequenciamento dos genes ACCase e EPSPS foram conduzidos no Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas – ESALQ/USP. Quando o capim-pé-de-galinha tinha quatro folhas totalmente expandidas, o DNA de cinco plantas de cada população S e R-F₁ e geração R-F₂ foram extraídos com uso do método CTAB descrito por Doyle (1987). A concentração e qualidade do DNA foram avaliadas em gel de agarose (1% v/v). Um fragmento EPSPS de 300 pb foi amplificado usando primers sugerido por Kaundun

et al. (2008) para verificar as mutações nas posições 102 e 106, enquanto dois fragmentos da ACCase (440 pb e 436 pb) foram investigados utilizando dois conjuntos de primers conforme Cha et al. (2014), o primeiro contendo o códon para substituição Ile1781 e o segundo para outros seis códons Trp1999, Trp2027, Ile2041, Asp2078, Cys-2088 e Gly2096 (Tabela 1).

Tabela 1. Primers usados para reação em cadeia da polimerase (PCR) de capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica*) suscetível e resistente R-F₁ e geração R-F₂ aos inibidores da ACCase e EPSPS.

Identificação do primer	Sequenciamento	Sequência do oligonucleotídeo (5'-3')
K_F	EPSPS	CTCTTCTTGGGGAATGCTGGA
K_R		TAACCTTGCCACCAGGTAGCCCTC
ACC-F1a	Fragmento A da	TCATTTGGCCCAAGGGAAGATGC
ACC-R1a	ACCase	CGTATGCCAAGTCGAGCAAGATA
ACC-F1b	Fragmento B da	GTTGGTGTATAGCTGTGGAGACACA
ACC-R1b	ACCase	ACTTGATCTCAATCAACCCTTGAGG

F: forward, R: revers

A PCR foi realizada com as seguintes características: 1 µL de cada DNA (100 ng/µl); 5 µL de tampão green 5xGoTaq®; 0,5 µL dNTPs 10mM; 1 µL da mistura de primers (10 pmol/µL), 16,30 µL de água Milli-Q, e 0,2 µL de GoTaq® DNA polimerase, completando o volume de 25 µL. As configurações de ciclagem de PCR foram: 1 ciclo de 95 °C por 5 min, 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s, 72 °C por 2 min e uma extensão final a 72 °C para 10 min.

Antes do sequenciamento, os produtos de PCR foram purificados usando Kit de purificação por PCR. Uma vez purificado, a integridade do produto de PCR foi confirmada por eletroforese capilar. Os produtos de PCR de cinco plantas S e cinco plantas R foram sequenciados usando analisador genético ABI 3730 DNA Analyser.

3.2.3. Análise do número de cópias e expressão dos genes ACCase e EPSPS via qPCR

O experimento de expressão das enzimas ACCase e EPSPS foram conduzidos no Laboratório de Biologia Celular e Molecular – CENA/USP. Os tecidos foliares de dez plantas S e R-F₁ e geração R-F₂ de capim-pé-de-galinha foram coletados, triturados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C antes da extração do RNA. A extração do RNA foi realizada seguindo as instruções do fabricante do Kit Trizol a partir de 50 mg de tecidos congelados

moídos. O extrato total de RNA foi diluído em 20 mL de água DEPC a 0,1%. As amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm usando o NanoDrop™ 2000c. As amostras de RNA foram tratadas com DNase I livre de RNase e o cDNA da primeira fita foi sintetizado a partir de 1000 ng do RNA total usando o iScript cDNA Synthesis Kit. DNA genômico total também foi extraído com um extrator de DNA.

Para cDNA e DNA genômico, os primers de EPSPS e ACCase foram projetados de acordo com Chen et al. (2015) e Cha et al. (2014), além do padrão interno usando a β -actina (Tabela 2). As reações foram realizadas em um sistema de PCR em tempo real StepOnePlus™ usando o Kit Power UP SYBR Green master Mix, seguindo as instruções do fabricante. DNA genômico e o cDNA (100 ng cada) foi amplificado usando dados quantitativos em tempo real PCR com volume total de 20 μ l nas seguintes condições: 10 min a 42°C; 10 min a 95°C; 40 ciclos de amplificação de cDNA por 15s a 95 °C, 20 s a 59 °C e 30 s a 72 °C com gravação de sinal fluorescente. No final, uma etapa final de 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C e a fluorescência medida em cada variação de 0,7 °C (de 60 a 95 °C).

Tabela 2. Primers usados para reação PCR quantitativo (qPCR) de capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica*) suscetível e resistente R-F1 e geração R-F2 aos inibidores da ACCase e EPSPS.

Identificação do primer	Expressão	Sequência do oligonucleotídeo (5'-3')
GF	EPSPS	CTGATGGCTGCTCCTTTAGCTC
GR		CCCAGCTATCAGAATGCTCTGC
Q2-F1a	ACCase	TTGACTCTGTTGTGGGCAAGG
ACC-R1a		CGTATGCCAAGTCGAGCAAGATA
β -actina_F	Padrão interno	AACAGGGAGAAGATGACCCAGA
β -actina_R		GCCCACTAGCGTAAAGGGACAG

F: forward, R: revers

A quantificação de EPSPS e ACCase foi calculada como $\Delta C_t = (C_t \text{ de EPSPS ou ACCase} - C_t \text{ de } \beta\text{-actina})$ e o relativo aumento no número de cópias EPSPS ou ACCase foi expresso como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Cada amostra foi executada em três repetições para calcular a média e desvio padrão. Os resultados foram representados como o aumento da dobra no número de cópias da ACCase e EPSPS em relação à β -actina. As médias

foram comparadas pelo teste *tukey* ($p < 0,05$) para o número de cópias genômicas e níveis de expressão das enzimas.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Sequenciamento e expressão do gene ACCase em populações suscetível e resistente de *E. indica*

Duas regiões do domínio carboxil-transferase (CT) da ACCase plastídica (fragmentos A e B) contendo todos os locais de mutação conhecidos (Délye et al., 2005; Liu et al., 2007) foram amplificados por padrão PCR e o tamanho dos fragmentos foi de aproximadamente 500 pb de comprimento (Figura 1), o que está de acordo com o trabalho realizado por Cha et al. (2014).

Figura 1. Análise de PCR de 5 indivíduos de populações de capim-pé-de-galinha suscetível (S) e resistente (R_{F1} e R_{F2}). Dois fragmentos de aproximadamente 500 pb gerado pela amplificação do primer desenhado por Cha et al. (2014).

O sequenciamento do fragmento A do gene ACCase descartou-se a possibilidade da mutação Ile1781Leu ser a responsável pela resistência de *E. indica* aos inibidores da ACCase. Além disso, cinco pontos-alvos conhecidos no fragmento B Trp1999, Trp2027, Ile2041, Cys2088 e Gly2096 também não explica a evolução da resistência aos herbicidas inibidores ACCase. Por fim, uma mutação não-sinônima de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no segundo nucleotídeo do códon do aminoácido (A para G) na posição 2078, resultou na troca de uma asparagina para uma glicina Asp2078Gly, conferindo resistência cruzada FOP e DIM, o que não foi verificado para população suscetível (Figura 2).

	2064	2066	2068	2070	2072	2074	2076	2078	2080	2082										
JQ684524.1	CCC	ATG	GCT	GGA	CTA	CGT	GGA	GGA	GCT	TGG	GTC	GGT	TTA	GAT	AGC	AAA	ATA	ATA	CCG	
<i>E. indica</i> S	CCC	ATG	GCT	GGA	GGA	CTA	CGT	GGA	GGA	GCT	TGG	GTC	GGT	TTA	GAT	AGC	AAA	ATA	ATA	CCG
<i>E. indica</i> R _{F1}	CCC	ATG	GCT	GGA	GGA	CTA	CGT	GGA	GGA	GCT	TGG	GTC	GGT	TTA	GGT	AGC	AAA	ATA	ATA	CCG
<i>E. indica</i> R _{F2}	CCC	ATG	GCT	GGA	GGA	CTA	CGT	GGA	GGA	GCT	TGG	GTC	GGT	TTA	GGT	AGC	AAA	ATA	ATA	CCG
	2065	2067	2069	2071	2073	2075	2077		2079	2081	2083									

Figura 2. Alinhamento do fragmento da ACCase de população suscetível de capim-pé-de-galinha da Malásia (JQ684524.1) e do Brasil (S, R_{F1} e R_{F2}). As bases nitrogenadas dentro do quadrado representam a substituição do códon GAT para GGT na posição 2078 em populações resistentes, o que resulta na mutação Asp2078Gly responsável pelo mecanismo de resistência.

A asparagina é um aminoácido hidrofílico polar, enquanto a glicina é hidrofóbica apolar. Essa mudança na posição 2078 causa a remoção total do grupo carboxila que se projetava fortemente dentro da cavidade do sítio ativo do domínio CT da ACCase (Délye et al., 2005). Nesse sentido, pode-se propor que a mutação pontual Asp2078Gly afetou o sítio de ligação prejudicando a interação de alguns herbicidas com a enzima ACCase, casos de fenoxaprop, haloxyfop, fluazifop e sethoxydim, mas responderam de forma diferente para clethodim, tepraloxymid, quizalofop-ethyl e quizalofop-tefuryl, ainda suscetíveis a esses graminicidas.

Esse padrão de resistência cruzada a FOP e DIM observado para população de *E. indica* de Primavera do Leste-MT é consistente com o tipo de mutação evoluída nessa espécie. Em outras populações de capim-pé-de-galinha do Brasil e Estados Unidos, a mutação Asp2078Gly causou resistência cruzada as classes FOP e DIM (Osuna et al., 2012 e McCullough et al., 2016). Em um caso muito recente de resistência múltipla de capim-pé-de-galinha no Brasil, a população resistente mostrou novamente a mutação de Asp2078Gly com resistência aos grupos químicos FOP e DIM, além de pinoxaden (DEN) antes de sua comercialização no país (Vázquez-García et al., 2021). Portanto, não exclui as chances da população deste estudo R_{F1} e geração R_{F2} serem resistentes ao grupo DEN.

De fato, essa mutação Asp2078Gly foi relada para conferir amplo espectro de resistência a todas as classes de herbicidas inibidores de ACCase em cinco importantes espécies gramíneas, como *Avena fatua*, *Alopecurus myosuroides*, *Lolium multiflorum*, *L. rigidum* e *Phalaris paradoxa* (Yu et al., 2007; Hochberg et al., 2009; Kaundun et al., 2010; Petit et al., 2009; Cruz-Hipolito et al., 2011). Além disso, essa mutação no sítio de ação da ACCase também está relacionada a resistência de mais quatro espécies, *A. aequalis*, *A. japonicus*, *A. sterilis* e *P. minor* (Liu et al., 2007; Cruz-Hipolito et al., 2015; Guo et al., 2015; Chen et al., 2017). Esses achados apoiam fortemente o envolvimento da mutação

Asp2078Gly fornecendo ampla resistência e de alto nível aos inibidores da ACCase em diferentes espécies.

Outra mutação Trp2027Cys bem conhecida por causar resistência aos inibidores da ACCase evoluiu em *E. indica* com resistência a fluazifop em populações da Malásia (Cha et al., 2014). Até agora, essa mutação foi reportada apenas para uma população de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) no Brasil (Takano et al., 2020). Como esperado a amplificação do gene ACCase não tem qualquer envolvimento com a resistência aos inibidores da ACCase em *E. indica* (Figura 3), ambas as populações S e R-F₁ e geração R-F₂ possuíam apenas uma cópia da ACCase e níveis similares da transcrição ACCase.

Figura 3. Quantificação relativa do número de cópias genômicas e transcriptômicas de ACCase em *Eleusine indica* com resistência múltipla aos inibidores da ACCase e EPSPS de Brasil, usando β -actina como gene de referência. Os dados foram reunidos a partir de dois experimentos com três repetições por tratamento e biótipo. As médias não diferiram pelo teste *Tukey* ($P < 0,05$).

Embora a maior atividade específica da enzima ACCase pudesse indicar uma superprodução do próprio sítio de ação para plantas resistentes de *Sorghum halepense* e *Leptochloa chinensis* (Bradley et al., 2001; Pornprom et al., 2006), mais tarde o papel da expressão gênica da ACCase, com cerca de 5 a 9 vezes mais cópias foi confirmada como importante mecanismo de resistência em *Digitaria sanguinalis* (Laforest et al., 2017). Nesse estudo, a expressão gênica da ACCase não está associada a mutação Asp2078Gly na população de *E. indica* que evoluiu resistência cruzada a FOP e DIM.

3.3.2. Sequenciamento e expressão do gene EPSPS em populações suscetível e resistente de *E. indica*

A região que engloba as posições 102 e 106 do gene da EPSPS, as quais estão relacionadas a casos documentados de resistência ao glyphosate em *E. indica* foi amplificada via reação PCR e o tamanho do fragmento foi em torno de 300 pb (Figura 4), o que está de acordo com o trabalho realizado por Kaundun et al. (2008).

Figura 5. Análise de PCR de 5 indivíduos de populações de capim-pé-de-galinha suscetível (S) e resistente (R_{F1} e R_{F2}). Fragmento de 330 pb gerado pela amplificação do primer desenhado por Kaundun et al. (2008).

O sequenciamento do fragmento de 300 pb do gene da EPSPS revelou que a população R_{F1} e geração R_{F2} não possuíam a mutação conhecida na posição 106, que é ocupada pelo aminoácido prolina (códon CCA), conforme a sequência de nucleotídeos da população S (Figura 5). Além disso, não foram descobertas mutações adicionais nessa sequência, como a posição 102, ocupada pelo aminoácido treonina (códon ACT) que também confere resistência de plantas daninhas ao glyphosate. Isso comprova que o mecanismo de resistência dessa população de Primavera do Leste-MT, não envolve alteração no sítio de ação, ao contrário de outras duas populações do Brasil que tinham uma mutação SNP na posição 106 (Pro106Ser) conferindo resistência ao glyphosate em *E. indica* (Takano et al., 2018; Vázquez-García et al., 2021).

	096	098	100	102	104	106	108	110	112	114										
AY157642 MS	TTC	TTG	GGG	AAT	GCT	GGA	ACT	GCA	ATG	CGA	CCA	TTG	ACA	GCA	GCC	GTA	ACT	GCT	GCT	GGA
AY157643 MR	TTC	TTG	GGG	AAT	GCT	GGA	ACT	GCA	ATG	CGA	TCA	TTG	ACA	GCA	GCC	GTA	ACT	GCT	GCT	GGA
<i>E. indica</i> S	TTC	TTG	GGG	AAT	GCT	GGA	ACT	GCA	ATG	CGA	CCA	TTG	ACA	GCA	GCC	GTA	ACT	GCT	GCT	GGA
<i>E. indica</i> R _{F1}	TTC	TTG	GGG	AAT	GCT	GGA	ACT	GCA	ATG	CGA	CCA	TTG	ACA	GCA	GCC	GTA	ACT	GCT	GCT	GGA
<i>E. indica</i> R _{F2}	TTC	TTG	GGG	AAT	GCT	GGA	ACT	GCA	ATG	CGA	CCA	TTG	ACA	GCA	GCC	GTA	ACT	GCT	GCT	GGA
	097	099	101	103	105	107	109	111	113	105										

Figura 5. Alinhamento do fragmento da EPSPS de populações suscetível e resistente de capim-pé-de-galinha da Malásia (AY157642 MS e AY157643 MR) e do Brasil (S, R_{F1} e R_{F2}). As bases em cinza realçam a ausência de mutação na posição 106 nas populações resistentes.

Em outros países agrícolas, diversos trabalhos documentaram que *E. indica* foi capaz de evoluir mutações no sítio de ação contra o herbicida glyphosate. O primeiro caso de mutação Pro106Ser foi reportada em uma população resistente de *E. indica* da Malásia (Baerson et al., 2002). Nos EUA, a mutação Pro106Ser está disseminada em várias populações de diferentes regiões do país (Kaundun et al., 2008; Molin et al., 2013; Huffman et al., 2016; Mueller et al., 2011). Casos mais raros de dupla mutação TIPS (Tre102Ile e Pro106Ser) foram encontradas na Malásia e China, o que confere populações altamente resistentes ao glyphosate (Chen et al., 2015; Yu et al., 2015). No México, essa espécie evoluiu simultaneamente a dois mecanismos de sítio de ação, uma mutação Pro106Ser e uma superexpressão da EPSPS (Gherekhloo et al., 2017).

Figura 3. Quantificação relativa do número de cópias genômicas e transcriptômicas de EPSPS em *Eleusine indica* com resistência múltipla aos inibidores da ACCase e EPSPS de Brasil, usando β -actina como gene de referência. Os dados foram reunidos a partir de dois experimentos com três repetições por tratamento e biótipo. As médias não diferiram pelo teste *Tukey* ($P < 0,05$).

O mecanismo de amplificação do gene da EPSPS também foi investigado neste estudo, onde a população R_{F1} e a geração R_{F2} possuíam apenas uma cópia da EPSPS e por isso os níveis de expressão de EPSPS não diferiram da população S (Figura 6). A resistência

de *E. indica* ao glyphosate devido a amplificação do gene EPSPS foi relatada, aumentando-se 17 vezes o número de cópias de EPSPS (Chen et al., 2017). Deng et al. (2020) também menciona aumento de 6 a 10 vezes mais cópias de EPSPS na população resistente a glyphosate. Nossos resultados leva a entender que o mecanismo de resistência não está relacionado ao sítio de ação do glifosato. Portanto, a resistência ao glyphosate foi baseado em um mecanismos *non-target-site*, como será abordado posteriormente.

3.4. Conclusões

A mutação Asp2078Gly no gene ACCase conferiu resistência cruzada aos grupos químicos FOP e DIM, enquanto nenhuma mutação nas posições 102 e 106 foi encontrada no gene EPSPS.

A superexpressão das enzimas ACCase e EPSPS não estão associadas a resistência múltipla de capim-pé-de-galinha aos inibidores da ACCase e glyphosate.

Referências

- Baerson S.R. et al. (2002) Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiology*, 129:1265-75.
- Basil J. et al. (2003). Plant biotin-containing carboxylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 414:211–222.
- Bradley, K.W. et al. (2001). The mechanism of resistance to aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione herbicides in a johnsongrass biotype. *Weed Science*, 49:477-484.
- Cecile P. et al. (2010). Prevalence of cross- or multiple resistance to the acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors fenoxaprop, clodinafop and pinoxaden in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) in France. *Pest Management Science*; 66:168–177.
- Cha, T. et al. (2014) Molecular basis for resistance to ACCase-inhibiting fluazifop in *Eleusine indica* from Malaysia. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 111:7-13.
- Chen J. et al. (2015) Mutations and amplification of EPSPS gene confer resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*). *Planta*, 242:859-868.
- Chen, J. et al. (2017) Characterization of *Eleusine indica* with gene mutation or amplification in EPSPS to glyphosate. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 143:201-206.

Christophe D. et al. (2005). Molecular bases for sensitivity to Acetyl-Coenzyme A Carboxylase inhibitors in black-grass. *Plant Physiology*, 137:794-806.

Cruz-Hipolito et al. (2011). Mechanism of resistance to ACCase-inhibiting herbicides in wild oat (*Avena fatua*) from Latin America. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59:7261-7267.

Cruz-Hipolito H. et al. (2015) Ile-1781-Leu and Asp-2078-Gly Mutations in ACCase Gene, Endow Cross-resistance to APP, CHD, and PPZ in *Phalaris minor* from Mexico (2015). *International Journal of Molecular Sciences*, 16:21363-21377.

Deng, W. et al. (2020) Cyhalofop-butyl and glyphosate multiple herbicide resistance evolved in an *Eleusine indica* population collected in Chinese direct-seeding rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68:2623-2630.

Doyle, J.J. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19:11-15.

Duke, S.O. & Powles, S.B. (2008) Mini-review glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64:319-325.

Frans J.E. et al. (1997). Glyphosate: a unique global herbicide *American Chemical Society*, 189:521–615.

Gherekhloo J. et al. (2017) Pro-106-Ser mutation and EPSPS overexpression acting together simultaneously in glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica*). *Scientific Reports*, 7: 6702.

Gornicki P. et al. (1994). Wheat acetyl-coenzyme A carboxylase:cDNA and protein structure. *PNAS*, 91:6860–6864.

Guo W. et al. (2015) Multiple resistance to ACCase and AHAS-inhibiting herbicides in shortawn foxtail (*Alopecurus aequalis* Sobol.) from China. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 124: 66–72.

Harwood J.L. (1988). Fatty acid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*, 39:101–138.

Heap I. International survey of herbicide resistant weeds. [acessado em: 27 de abril de 2021]. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/default.aspx>>.

- Hugh J. B.; François J. (2012) Tardif herbicide cross resistance in weeds. *Crop Protection*, 35:15-28.
- Jalaludin A. et al. (2014) Multiple resistance across glufosinate, glyphosate, paraquat and ACCase-inhibiting herbicides in an *Eleusine indica* population. *Weed Research*, 55: 82-89.
- Kaundun S.S. et al. (2008) Importance of the P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in a goosegrass (*Eleusine indica*) population from the Philippines. *Weed Science*, 56:637-46.
- Kaundun, S.S. (2014) Resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides. *Pest Management Science*, 70:1405–1417.
- Kaundun, S.S. 2010. An aspartate to glycine change in the carboxyl transferase domain of acetyl CoA carboxylase and non-target-site mechanism(s) confer resistance to ACCase inhibitor herbicides in a *Lolium multiflorum* population. *Pest Management Science*, 66:1249-1256.
- Kukorelli, G.; Reisinger, P.; Pinke, G. 2013. ACCase inhibitor herbicides: selectivity, weed resistance and fitness cost, a review. *International Journal of Pest Management*, 59:165-173.
- Laforest, M. et al. (2017) Acetyl-CoA carboxylase overexpression in Herbicide resistant large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*). *Pest Management Science*, 73:2227-2235.
- Liu, W. et al. (2007) Single-site mutations in the carboxyltransferase domain of plastid acetyl-CoA carboxylase confer resistance to grass-specific herbicides. *PNAS*, 104:3627-3632.
- Livak, J.K. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. *Methods*, 25:402-408.
- McCullough, P.E. et al. (2016) First Report of ACCase-Resistant Goosegrass (*Eleusine indica*) in the United States. *Weed Science*, 64:399-408.
- Mueller, T.C. et al. (2011) Glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) confirmed in Tennessee. *Weed Science*, 59:562-6.
- Osuna, M.D. et al. (2012) Resistance to ACCase inhibitors in *Eleusine indica* from Brazil involves a target site mutation. *Planta Daninha*, 30:675–681.
- Peterson, M.A. et al. (2018) The challenge of herbicide resistance around the world: a current summary . *Pest Management Science*, 74:2246 - 2259.

- Pornprom, T.; Mahatamnuchoke, P. & Usui, K. (2006) The role of altered acetyl-CoA carboxylase in conferring resistance to fenoxaprop-p-ethyl in Chinese sprangletop (*Leptochloa chinensis* (L.) Nees). *Pest Management Science*, 62:1109-1115.
- Powles, S.B. & Preston, C. (2006) Evolved Glyphosate Resistance in Plants: Biochemical and Genetic Basis of Resistance. *Weed Technology*. 20:282-289.
- Powles, S.B. & Yu, Q. (2010) Evolution in action: plants resistant to herbicides . *Annual Review of Plant Biology*, 61:317-347.
- Sasaki , Y. & Nagano, Y. (2004) Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68:1175-1184.
- Schönbrunn, E. et al., (2001) Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5 enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *PNAS*, 98:1376-1380.
- Takano, H. K. et al. (2018). Proline-106 EPSPS mutation imparting glyphosate resistance in Goosegrass (*Eleusine indica*) emerges in South America. *Weed Science*, 67:48-56.
- Takano, H. K. et al. (2020) Trp2027Cys mutation evolves in *Digitaria insularis* with cross-resistance to ACCase inhibitors. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 164:1-6.
- Takano, H.K. et al. (2021). ACCase-inhibiting herbicides: mechanism of action, resistance evolution and stewardship. *Scientia Agricola*, 78:1-11.
- Tranel, P.J. (2017) Herbicide-resistance mechanisms: gene amplification is not just for glyphosate. *Pest Management Science*, 73:2225-2226.
- Vázquez-García et al. (2021) Multiple herbicide resistance evolution: The case of *Eleusine indica* in Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69:1197–1205.
- Weaver, L. M., and Herrmann, K. M. (1997). Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends in Plant Science*, 2:346-351.
- Yu Q. et al. (2015) Evolution of a double amino acid substitution in the 5 enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Eleusine indica* conferring high-level glyphosate resistance. *Plant Physiology*, 167:1440-7.
- Yu, Q. et al. (2007) 2007. Diversity of acetyl-coenzyme A carboxylase mutations in resistant *Lolium* populations: evaluation using clethodim. *Plant Physiology*, 145:547-558.

4. MECANISMOS *NON-TARGET-SITE* DA RESISTÊNCIA MÚLTIPLA DE *Eleusine indica* AOS INIBIDORES DA ACCASE E EPSPS

RESUMO

Objetivo deste trabalho foi estudar e avaliar os possíveis mecanismos *non-target-site resistance* (NTSR) que conferem resistência a população de *E. indica* para sobreviver ao controle pelo fenoxaprop-p-ethyl e glyphosate. Para isso, foi comparada a absorção foliar e a translocação do ^{14}C -fenoxaprop e ^{14}C -glyphosate na população suscetível (S) e resistente (R-F_1 e geração R-F_2), em função do tempo após a aplicação dos herbicidas. Além disso, o metabolismo por inibidor da P450 foi estudado para fenoxaprop e glyphosate. Um perfil metabólico foi avaliado em quatro pontos no tempo após a aplicação de glyphosate em plantas suscetíveis e resistentes. As populações suscetível e resistente mostraram padrões similares de absorção e translocação dos herbicidas radiomarcados. A aplicação de inibidores da P450, 30 minutos antes da aplicação do fenoxaprop não teve reposta para populações de *E. indica*. Para o glyphosate, a aplicação prévia dos inibidores da P450 causaram mais injúrias visuais às plantas resistentes, porém não constatou a reversão da resistência. A população R-F_1 e geração R-F_2 apresentaram menor acúmulo de ácido chiquímico em comparação com a população S. Os níveis de glyphosate diminuiu expressivamente nas plantas resistentes no decorrer do tempo, principalmente aos 96 e 168 HAT, contrário ao observado para as plantas suscetíveis. Os níveis de AMPA foram baixos para as populações resistentes e retornaram zero após 168 HAT. Os baixos níveis de glyphosate não foram acompanhados por altos níveis de AMPA, principal metabólito do herbicida. Portanto, um mecanismo *non-target-site resistance* ainda desconhecido pode desintoxicar planta resistente do glyphosate exigindo novas pesquisas.

Palavras-chave: absorção e translocação; ácido chiquímico; ácido aminometilfosfônico; desintoxicação de glifosato

ABSTRACT

The objective of this work was to study and evaluate the possible non-target-site resistance (NTSR) mechanisms that provide resistance to the *E. indica* population to survive the control by fenoxaprop-p-ethyl and glyphosate. For this, leaf absorption and translocation of ^{14}C -fenoxaprop and ^{14}C -glyphosate in the susceptible (S) and resistant (R-F_1 and R-F_2 generation) populations were compared, depending on the time after herbicide application. In addition, P450 inhibitor metabolism has been studied for fenoxaprop and glyphosate. A metabolic profile was evaluated at four points in time after the application of glyphosate in susceptible and resistant plants. The susceptible and resistant populations showed similar patterns of absorption and translocation of the radiolabeled herbicides. The application of P450 inhibitors, 30 minutes before the application of fenoxaprop did not have a response to *E. indica* populations. For

glyphosate, the previous application of P450 inhibitors caused more visual injuries to resistant plants, but there was no reversion of resistance. The population R-F₁ and generation R-F₂ showed less accumulation of shikimic acid compared to the population S. The levels of glyphosate decreased significantly in resistant plants over time, mainly at 96 and 168 HAT, contrary to what was observed for plants susceptible. AMPA levels were low for resistant populations and it becomes zero after 168 HAT. Low levels of glyphosate were not accompanied by high levels of AMPA, the main metabolite of the herbicide. Therefore, a still-unknown non-target-site resistance mechanism can detoxify the glyphosate resistant plant, requiring further research.

Keywords: absorption and translocation; shikimic acid; aminomethylphosphonic acid; glyphosate detoxification

4.1. Introdução

As plantas daninhas podem evoluir resistência de local não-alvo (*non-target-site resistance* - NTSR) a diferentes modos de ação de herbicidas. Os principais mecanismos NTSR envolve alterações expressiva nos processos fisiológicos de absorção, translocação e metabolismo de herbicidas (Ghanizadeh & Harrington, 2017). Todos esses mecanismos conseguem diminuir a quantidade de herbicida que atinge o sítio de ação dentro da planta (Powles & Yu, 2010).

As diferenças na absorção foliar do herbicida pode ser atribuído às alterações nas propriedades anatômicas da folha (Délye et al., 2013). Entretanto, a absorção reduzida não é frequente para conferir resistência a herbicidas e normalmente está relacionado a outro mecanismo, principalmente a translocação reduzida (Gaines et al., 2020). Esse mecanismo impede o herbicida de translocar para os tecidos jovens da planta concentrado a maior parte na folha tratada (Gaines et al., 2019).

A redução da translocação tem sido atribuída à evolução de um transportador que sequestra o glyphosate dentro do vacúolo da planta, evitando que ele alcance o cloroplasto (Shaner, 2009). Esse mecanismo de rápido sequestro vacuolar de glyphosate foi reportado em *Conyza canadensis* (Ge et al., 2010) e *Lolium* spp. (Ge et al., 2012), contudo os genes específicos responsáveis para translocação limitada ainda não foram esclarecidos. Fato que merece atenção, a baixa temperatura diminui significativamente o sequestro vacuolar de glyphosate em *C. canadensis* (Ge et al., 2011).

Proteínas transportadoras ABC (ATP-binding cassette) ligadas a membrana plasmática podem estar envolvidas no sequestro vacuolar de glyphosate, como sugerido para

espécie *C. canadensis* (Yuan et al., 2007; Yuan et al., 2010; Tani et al., 2015). Uma pesquisa muito recente, fornece fortes evidências do papel de um transportador ABC de planta (ABCC8) que atua como um exportador de glyphosate de membrana plasmática, caminhando o herbicida para fora das células das plantas antes que tivessem tempo de causar um efeito tóxico (Pan et al., 2021).

Até o momento, nenhum mecanismo NTSR semelhante foi relatado para conferir *Eleusine indica* resistência ao glyphosate ou qualquer outra planta daninha gramínea para evoluir resistência aos herbicidas inibidores da ACCase, com base em algumas revisões sobre mecanismos de resistência a herbicidas (Kaundun et al., 2014; Gaines et al., 2019; Jugulam & Shyam, 2019;). Por outro lado, o metabolismo foi registrado em *E. indica* como importante mecanismo de resistência a fluazifop-p-butyl e diclofop-methyl (Wang et al., 2017; Vázquez-García et al., 2021).

Metabolismo aprimorado é a capacidade que uma espécie de planta daninha evoluiu para degradar o herbicida em compostos menos tóxicas, regulado pelas monooxigenases do citocromo P450 (CYP-P450), glutathione S-transferases (GSTs) ou glicosiltransferases (GTs) (Gaines et al., 2020). CY-P450 exerceu um papel importante em *Poa annua* para conferir resistência a fenoxaprop-p-ethyl (Wang et al., 2013), assim como GSTs conferiu resistência em *Echinochloa phyllopogon* e *Alopecurus myosuroides* (Cummins et al., 1997; Bakkali et al., 2007). A resistência cruzada de *E. phyllopogon* aos inibidores de ACCase foi mediada pelas enzimas CYP81A12 e CYP81A21 (Iwakami et al., 2019).

Considerando os principais mecanismos para conferir resistência a glyphosate, desacreditava-se na possibilidade de uma espécie evoluir a capacidade de metabolizar (desintoxicar) o glyphosate (Gaines et al., 2019). A superexpressão de um gene aldo-ceto redutase (AKR) foi a primeira evidência para conferir resistência ao glyphosate em arroz, embora nenhum dos metabólitos tenham sido fornecidos (Vemanna et al., 2017). Mais tarde, a degradação aprimorada do glyphosate foi confirmada como o mecanismo de resistência em *Echinochloa colona*, mais importante a enzima AKR que oxida o glyphosate a AMPA e glioxalato (Pan et al., 2019).

Não existem na literatura evidências que comprovem a possibilidade de *E. indica* desenvolver mecanismos NTSR para conferir resistência ao glyphosate. Assim, o objetivo neste capítulo foi estudar e avaliar os processos de absorção, translocação e metabolismo, utilizando o fenoxaprop-p-ethyl, um inibidor da ACCase e glyphosate como inibidor da EPSPS.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Materiais vegetais e condições de crescimento

A população suscetível (S) e resistente (R-F₁ e geração R-F₂) de capim-pé-de-galinha foram semeadas em vasos (0,25 dm³ de volume) contendo solo de textura argilosa previamente adubado com 575 mg de N, 500 mg P₂O₅ e 500 mg K₂O por dm³ de solo. As plantas foram crescidas em casa-de-vegetação do Departamento de Fitotecnia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz em Piracicaba, São Paulo. Após a emergência, as plantas foram desbastadas para manter uma planta por vaso. Cada vaso (unidade experimental) foi colocado sobre um vasilhame de maior diâmetro e sem orifícios para o suprimento hídrico das plantas. A umidade do solo foi controlada periodicamente, repondo-se a água nos vasilhames sempre que necessário. Nos experimentos de absorção, translocação e inibidores da P450, registrou-se as seguintes condições ambientais (médias): temperatura de 25 °C e umidade relativa de 80%; enquanto no experimento de metabolismo, temperatura de 23 °C e umidade relativa de 74%; todos sob iluminação natural.

4.2.2. Absorção e translocação de ¹⁴C-glyphosate e ¹⁴C-fenoxaprop

Dois experimentos foram realizados, um com glyphosate e outro com fenoxaprop no laboratório de Ecotoxicologia, CENA/USP. As plantas S e R-F₁ e geração R-F₂ foram tratadas com os herbicidas quando tinham quatro folhas totalmente expandidas. A segunda folha mais velha foi marcada e coberta com papel alumínio, antes do restante da planta receber uma pulverização de 1000 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate no primeiro experimento e 110 g ha⁻¹ de fenoxaprop no segundo experimento. Para ambas as aplicações, foi utilizado pulverizador costal, pressurizado a CO₂, com pontas de pulverização do tipo leque Magno AD11002, que proporcionaram volume de aplicação de 200 L ha⁻¹.

Em condições laboratoriais, na folha marcada foi removido o papel alumínio, e uma solução contendo a mistura de ¹⁴C-glyphosate com glyphosate frio e ¹⁴C-fenoxaprop com fenoxaprop frio foi preparada e aplicada, cinco gotículas de 1 µL. A radioatividade total aplicada por planta de ¹⁴C-glyphosate e ¹⁴C-fenoxaprop foi 175.605,0 e 204.972,0 dpm, respectivamente.

A absorção e a translocação foram medidas às 24, 48 e 72 horas após o tratamento (HAT). Para cada avaliação no tempo, três repetições (plantas) foram colhidas

simultaneamente. As folhas tratadas foram removidas e lavadas com 3 mL de solução de metanol e água deionizada (1:1, v v⁻¹). Duas alíquotas de 500 µL do líquido proveniente dessa lavagem foram retiradas, adicionando-se 10 mL de solução cintiladora Instagel Plus, sendo analisados por espectrometria de cintilação líquida. Os resultados de cada alíquota foram extrapolados para o volume total da solução.

Partes separadas da planta seca (folha tratada, outras folhas e raízes) foram oxidadas em um oxidante biológico, seguido da medição de radioatividade nas amostras com espectrometria de cintilação líquida. Os valores de absorção foram calculados como:

$$\%Habs = [to/(to + fl) \times 100]$$

Onde: %Habs é a proporção de herbicida absorvido, to é a quantidade de ¹⁴C medida após a oxidação de todos os tecidos, e fl é a quantidade de ¹⁴C detectado na lavagem das folhas tratadas.

Para translocação dos herbicidas foi utilizado a seguinte equação:

$$\%Htr = 100 - [ft/(ft + of) \times 100]$$

Onde: %Htr é a proporção de herbicida translocado, ft é a quantidade de ¹⁴C medida na folha tratada e of é a quantidade de ¹⁴C detectada em outras folhas. A translocação também foi medida para raízes. A média de ¹⁴C-glyphosate e ¹⁴C-fenoxaprop recuperado foi de 88 e 83%, respectivamente. Absorção e translocação foram analisadas por meio do teste de Tukey (p<0,05) aplicando-se para cada tempo de avaliação.

4.2.3. Efeito da inibição da monooxigenases do citocromo P450

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições. As plantas suscetíveis e resistentes foram pulverizadas 30 minutos antes, com butóxido de piperolina (2000 g ha⁻¹) e clorpirifós (1000 g ha⁻¹) e, metade delas foram pulverizadas apenas com glyphosate (1000 g e.a. ha⁻¹) e fenoxaprop-p-ethyl (110 g ha⁻¹). Plantas de controle não tratadas foram incluídas para comparação, bem como plantas tratadas apenas com glyphosate. Para ambas as aplicações, foi utilizado pulverizador costal, pressurizado a CO₂, com pontas de pulverização do tipo leque Magno AD11002, fornecendo volume de aplicação equivalente a 200 L ha⁻¹.

As plantas permaneceram em casa de vegetação até 21 DAA, quando foram avaliadas visualmente (0% e 100% significam nenhum controle e a morte da planta, respectivamente). O tecido da parte aérea também foi coletado e seco a 65 °C até a massa seca

atingir a massa constante. O efeito dos inibidores da P450 foram analisadas por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$) aplicando-se para cada inseticida.

4.2.4. Metabolismo de glyphosate

As plantas de capim-pé-de-galinha suscetível (S), R-F₁ e geração R-F₂ foram cultivadas até o estágio de quatro folhas e tratadas com 1000 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate. A aplicação foi feita com pulverizador costal pressurizado, equipado com barra de 2 m de comprimento com quatro pontas de pulverização Magno AD11002. A pressão utilizada foi de 2 kPa, que forneceu o equivalente 200 L ha⁻¹.

As concentrações de glyphosate, ácido aminometilfosfônico (AMPA) e shiquimato foram quantificadas em 0 (no momento da aplicação), 24, 48, 72, 96 e 196 horas após o tratamento (HAT). A parte aérea das plantas foi coletada ao longo do tempo, acondicionadas em tubos Falcon com capacidade de 50 mL e armazenadas em ultracongelador a -80 °C. As amostras do tecido foliar foram maceradas em cadinho de porcelana contendo nitrogênio líquido e o tecido moído foi colocado em tubos Falcon de 15 mL e novamente armazenados em ultracongelador a -80 °C. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas (remoção da água) a -50 °C e padronizadas em cada tubo Falcon de 15 mL, 100 mg de tecido foliar (moído e liofilizado) e novamente armazenadas em ultracongelador a -80 °C até a análise.

Para a extração dos compostos, foram adicionados a cada tubo Falcon 10 mL de água acidificada a pH 2,5. Os tubos foram levemente agitados e, em seguida, submetidos a banho ultrassônico a 37 kHz por 30 minutos a temperatura de 55 °C.

Após a extração, todas as amostras foram centrifugadas em 4000 rpm por 10 minutos a 20 °C (rotina 38R) para separação de fases. Os sobrenadantes foram coletados e filtrados em um filtro Millex HV (Millipore) 0,45 µm equipado com uma membrana Durapore de 13 mm e embalados em um frasco âmbar de 9 mm (fornecimento de fluxo) com capacidade de 2 mL. A quantificação dos compostos foi realizada usando o equipamento Shimadzu Prominence UHPLC-MS/MS e espectrômetro de massa híbrido Triple Quad 4500 triplo quadrupolo (AB SCIEX).

Para otimizar as condições do espectrômetro de massa, injeções diretas com solução analítica padrão de 1 mg L⁻¹ de cada composto foram realizadas individualmente (Gomes et al., 2015). A partir das infusões das substâncias de teste, o modo de ionização da fonte [(ESI) ionização por eletropulverização] foi escolhido, que produz íons analitos na fase líquida antes

de entrar no espectrômetro de massa. O modo de ionização negativa foi usado para glyphosate, AMPA e ácido chiquímico.

Os compostos foram separados com uma coluna analítica Gemini 5 μ C18 (150 mm x 4,6 mm, 110 Å) a uma taxa de fluxo 0,6 mL min⁻¹ usando duas fases móveis: fase A (PA) consistia em 5 mM de acetato de amônio em água e fase B (PB) consistia em 5 mM de acetato de amônio em metanol. As condições cromatográficas usadas para quantificar os compostos foram: 0-1 min, 10% PB e 90% PA; 1-4 min, 95% PB e 5% PA; 4-8 min, 95% PB e 5% PA; 8-10 min, 10% PB e 90% PA; e 10-12 min, 10% PB e 90% PA.

O tempo total de corrida utilizado foi de 18 minutos independente dos compostos e 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. 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). As médias foram comparadas pelo teste de *tukey* ($p < 0,05$) aplicando-se para cada tempo de avaliação.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Absorção e translocação de ¹⁴C-glyphosate e ¹⁴C-fenoxaprop-p-ethyl

Aproximadamente 75% de ¹⁴C-glyphosate foi absorvido por plantas suscetíveis de capim-pé-de-galinha, sem diferenças significativas entre a população S e R-F₁ e geração R-F₂ (Figura 1 e 2). Nenhuma diferença de absorção extrapolou mais de 15% nos três pontos no tempo, portanto não houve indícios de absorção diferencial entre as populações.

Figura 1. Absorção e translocação de ^{14}C -glyphosate em 24, 48 e 72 h após o tratamento (HAT) em plantas suscetíveis ao glyphosate (S) e plantas resistentes (R-F1 e R-F2). (A) absorção de glyphosate, (B) glyphosate na folha tratada, (C) glyphosate em outras folhas e (D) glyphosate nas raízes. As médias são significativamente diferentes pelo teste tukey ($p < 0,05$). Barras representam o média $\pm$ erro padrão ($n = 3$).

Nenhuma diferença de absorção extrapolou mais de 15% nos três pontos no tempo, portanto não houve indícios de absorção diferencial entre as populações. Em todos os tempos, a translocação para outras folhas não diferiu entre as populações S e R-F1 e geração R-F2. Apenas aos 48 HAT, a translocação para raízes foi 6,1% menor para raízes da população resistente geração R-F2, mas esse comportamento não se repetiu para população R-F1. Da mesma forma, a folha tratada da população R-F1 tinha 15% menos ^{14}C -glyphosate presente na folha tratada do que a população S, mas isso também não aconteceu com a população geração R-F2. Populações resistentes de capim-massambará e azevém mostraram redução nos processos de absorção e translocação de ^{14}C -glyphosate (Vila-Aiub et al., 2012; Ghanizadeh et al., 2016). No entanto, esses mecanismos ainda não foram relatados em populações de capim-pé-de-galinha resistente ao glyphosate (Kaundun et al., 2008; Takano et al., 2018).

Figura 2. Autoradiografia de ^{14}C -glyphosate presente nas populações suscetível (S) e resistentes ($\text{R}_{\text{-F1}}$ e $\text{R}_{\text{-F2}}$) às 24, 48 e 72 horas após tratamento. Piracicaba, 2021.

Em 24 HAT, quase 90% de ^{14}C -fenoxaprop tinha sido absorvido pelas populações suscetível e resistente (Figura 3 e 4). Para todas as populações, a maior parte do herbicida permaneceu na folha tratada, com menos de 2% translocado para outras folhas e uma quantidade insignificante para as raízes.

Figura 3. Absorção e translocação de ^{14}C -fenoxaprop em 24, 48 e 72 h após o tratamento (HAT) em plantas suscetíveis ao glyphosate (S) e plantas resistentes (R-F₁ e R-F₂). (A) absorção de fenoxaprop, (B) fenoxaprop na folha tratada, (C) fenoxaprop em outras folhas e (D) fenoxaprop nas raízes. As médias são significativamente diferentes pelo teste *tukey* ($p < 0,05$). Barras representam o média $\pm$ erro padrão ($n = 3$).

Não há evidências de absorção e translocação diferencial entre as populações S e R-F₁ e geração R-F₂. Esses resultados corroboram com estudos anteriores que não encontraram diferenças na taxa de absorção e translocação de ^{14}C -fluazifop e ^{14}C -diclofop para populações suscetível e resistente de capim-pé-de-galinha (Leach et al., 1995; McCullough et al., 2016). Nenhuma diferença significativa nas taxas de absorção e translocação de ^{14}C -fenoxaprop foi encontrada entre populações resistentes e suscetíveis em outras espécies da família Poaceae (Tal et al., 1996; Kuk et al., 1999; Bakkali et al., 2007). Com base nesses estudos, a absorção e translocação não contribuiu para a resistência aos inibidores da ACCase e EPSPS na população resistente de capim-pé-de-galinha de Primavera do Leste, MT. No caso de glyphosate, o mecanismo de resistência ainda não foi esclarecido.

Figura 4. Autoradiografia de ^{14}C -fenoxaprop presente nas populações suscetível (S) e resistentes ($\text{R}_{\text{-F1}}$ e $\text{R}_{\text{-F2}}$) às 24, 48 e 72 horas após tratamento. Piracicaba, 2021.

4.3.2. Efeito da inibição monooxigenases do citocromo P450

Aplicação de PBO e clorpirifós 30 min antes do tratamento com fenoxaprop-p-ethyl não reverteu a capacidade evoluída das populações resistentes de sobreviver contra o herbicida (Tabela 1). Fenoxaprop-p-ethyl, com ou sem inibidor não causou lesão visual ou redução de massa seca em relação às plantas não tratadas. Esses resultados sugerem que as enzimas do citocromo P450 não estão associados com metabolismo de fenoxaprop-p-ethyl nas populações resistentes. Em uma população de *E. phyllopogon* resistente a inibidores de ACCase, a enzima CYP81A foi responsável por metabolizar os herbicidas diclofop-methyl, tralkoxydim e pinoxaden (Iwakami et al., 2019). O metabolismo de fenoxaprop-p-ethyl foi identificado em *Poa annua*, graças à ação das enzimas P450 (Wang et al., 2013). *E. indica* também evoluiu a capacidade de degradar fluazifop-p-butyl e diclofop-methyl em metabólitos não tóxicos para planta (Wang et al., 2017; Vázquez-García et al. 2021).

Tabela 1. Efeito dos inibidores butóxido de piperolina (PBO) e clorpirifós na resposta de *Eleusine indica* a fenoxaprop-p-ethyl em populações suscetível (S) e resistente (R) a herbicidas inibidores da ACCase e EPSPS.

Tratamento	Controle visual (%)		Massa seca relativa (%)	
	S	R	S	R
Não tratado	0,0	0,0	100,0	100,0 a
Fenoxaprop	100	0,0	0,0	92,9 a
PBO/Fenoxaprop	100	0,0	0,0	109,6 a
Clorpirifós/Fenoxaprop	100	0,0	0,0	88,1 a
Teste F	-	-	-	1,5 ^{ns}
CV (%)	-	-	-	19,1

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não são significativamente diferentes (teste de Tukey, $P \leq 0,05$). Os dados foram agrupados a partir das duas populações resistentes (R-F1 e R-F2) com três repetições cada ($n = 6$).

Supreendentemente, a aplicação de PBO e clorpirifós 30 min antes do tratamento com glyphosate causou mais lesões visuais do que apenas com glyphosate, porém não levou as plantas resistentes à morte (Tabela 2; Figura 5). Além disso, constatou menor quantidade de massa seca da parte aérea com aplicação dos inibidores da P450, mas não houve diferença significativa em relação a aplicação única de glyphosate. Dessa forma, estudos adicionais são necessários para determinar exatamente o envolvimento de enzimas P450 na resistência ao glyphosate. Até o momento, um estudo recente provou que o glyphosate pode ser metabolizado pelas enzimas aldo-ceto redutase em um capim-arroz resistente (Pan et al., 2019).

Tabela 5. Efeito dos inibidores butóxido de piperolina (PBO) e clorpirifós na resposta de *Eleusine indica* a glyphosate em populações suscetível (S) e resistente (R) a herbicidas inibidores da ACCase e EPSPS.

Tratamento	Controle visual (%)		Massa seca relativa (%)	
	S	R	S	R
Não tratado	0,0	0,0 c	100,0	100,0 a
Glyphosate	100	68,3 b	0,0	31,3 b
PBO/Glyphosate	100	90,5 a	0,0	10,8 b
Clorpirifós/Glyphosate	100	88,5 a	0,0	10,4 b
Teste F	-	97,7 **	-	62,4 **
CV (%)	-	17,0	-	34,5

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não são significativamente diferentes (teste de Tukey, $P \leq 0,05$). Os dados foram agrupados a partir das duas populações resistentes (R-F1 e R-F2) com três repetições cada ($n = 6$).

Figura 5. Aumento de injúrias em plantas de capim-pé-de-galinha resistente R-F₁ e R-F₂ com aplicação de clorpirifós (clor) e butóxido de piperolina (PBO) 30 minutos antes da aplicação de glyphosate (1000 g e.a. ha⁻¹). Piracicaba, 2021.

4.3.3. Perfil metabólico de *E. indica* suscetível e resistente ao glyphosate

As populações suscetível e resistente responderam diferentemente para as concentrações de glyphosate, ácido chiquímico e ácido aminometilfosfônico (AMPA), 24, 48, 96 e 196 horas após a aplicação do tratamento (HAT) de glyphosate (Figura 6). As concentrações de ácido chiquímico na parte aérea das plantas resistentes foi menor que nas plantas suscetíveis em todos os pontos ao longo do tempo. Após 168 HAT, a população suscetível acumulou 26,4 e 14,6 vezes a mais de ácido chiquímico do que as populações R-F₁ e geração R-F₂. Ambos podem ser usados como um indicativo de resistência ao glyphosate em plantas daninhas, devido à inibição da via EPSPS (Powles e Preston, 2006; Gazola et al., 2020).

Os níveis mais baixos de ácido chiquímico em plantas resistentes em comparação com plantas suscetíveis indicam que EPSPS é menos afetada pelo glyphosate em R-F₁ e geração R-F₂. Supõe-se que uma quantidade menor de glyphosate está atingindo a enzima EPSPS em plantas resistentes devido a um mecanismo NTSR. Essa hipótese é apoiada pelos níveis mais baixos de glyphosate nas populações resistentes observado em todos os pontos ao longo do tempo, principalmente 96 e 168 HAT. Curiosamente os baixos de valores de glyphosate não foram associados ao aumento dos níveis de AMPA nas plantas, principal metabólito de glyphosate (Duke, 2011).

Importante mencionar que na resistência de capim-pé-de-galinha a glyphosate no Brasil, a população resistente acumulou menos ácido chiquímico, os níveis de glyphosate e AMPA foram semelhantes entre as populações resistente e suscetível em todos os pontos no tempo, descartando qualquer papel do metabolismo, ao contrário o mecanismo foi atribuído à

mutação Pro106Ser (Takano et al., 2018). Neste estudo, constatamos resultados diferentes, por exemplo, no tempo de 168 HAT a concentração de AMPA nos biótipos R-F₁ e geração R-F₂ foi zero. Assim, questiona-se o destino da molécula de glyphosate, que nas populações R-F₁ e geração R-F₂ tiveram decréscimo de 89 e 83% na sua concentração após 168 HAT, respectivamente em comparação com a população suscetível.

Figura 6. Perfil metabólico de glyphosate em populações de capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica*) suscetível e resistente (R-F₁ e R-F₂). (A) concentração de ácido chiquímico; (B) concentração de glyphosate; (C) concentração de ácido aminometilfosfônico (AMPA). Piracicaba, 2021.

O metabolismo de glyphosate em compostos menos tóxicos não ocorre com muita frequência em plantas daninhas, e a relação entre o glyphosate e níveis de metabólitos muitas vezes não são claros (Sammons e Gaines 2014). Entretanto, uma pesquisa recente provou em *Echinochloa colona* o papel de enzimas aldo-ceto redutase na degradação metabólica de glyphosate para conferir níveis aumentados de AMPA e glioxalato na população resistente (Pan et al., 2019). Outro importante mecanismo NTSR é a presença de enzimas transportadores ABC (ATP-binding cassette) que direciona o glyphosate para dentro do vacúolo ou para o espaço do apoplasto da célula, não atingindo o sítio de ação tem sido associada à resistência de plantas daninhas a glyphosate (Yuan et al., 2007; Yuan et al., 2010; Tani et al., 2015; Pan et al., 2020). Com base nos resultados, sugere que a população de *E. indica* proveniente de Primavera do Leste, estado do Mato Grosso, evolui um mecanismo *non-target-site resistance* para conferir resistência ao glyphosate, contudo exige a realização de novos estudos para identificar precisamente o mecanismo envolvido. Um possível mecanismo de resistência a ser avaliado em pesquisas futuras seria o sequestro do herbicida ao vacúolo de células na população resistente.

4.4. Conclusão

A absorção e translocação diferencial, além do metabolismo por inibidores da P450 não estão associados à resistência aos inibidores da ACCase.

A Absorção e a translocação diferencial não são os mecanismos de resistência de *E. indica* ao glyphosate. Entretanto um mecanismo desconhecido de desintoxicação *non-target-site resistance* pode estar envolvido na resistência ao glyphosate.

Referências

- Bakkali, Y. et al. (2007) Late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*): Mechanisms involved in the resistance to fenoxaprop-p-ethyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:4052–4058.
- Cummins, I. et al. (1997) Glutathione transferases in herbicide-resistant and herbicide-susceptible black-grass (*Alopecurus myosuroides*). *Pesticide Science*, 51:244-250.
- Délye, C.; Jasieniuk, M. & Le Corre, V. (2013) Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, 29:649-658.

- Duke (2011) Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and -susceptible crops and weeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59:5835-5841.
- Gaines T.A. et al. (2020) Mechanisms of evolved herbicide resistance. *Journal of Biological Chemistry*. 295:10307–10330.
- Gaines T.A.; Patterson, E.L. & Neve, P. (2019) Molecular mechanisms of adaptive Evolution revealed by global selection for glyphosate resistance. *New Phytologist*, 223: 1770-1775.
- Gazola et al. (2020) Metabolic profiling of glyphosate-resistant sourgrass (*Digitaria insularis*). *Weed Technology*, 34(5):748-755.
- Ge X. et al. (2012). Vacuolar glyphosate-sequestration correlates with glyphosate resistance in ryegrass (*Lolium* spp.) from Australia, South America, and Europe: a ^{31}P NMR investigation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60:1243–1250.
- Ge, X. et al. (2010) Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. *Pest Management Science*, 66:345–348.
- Ge, X. et al. (2011) Glyphosate-resistant horseweed made sensitive to glyphosate: low-temperature suppression of glyphosate vacuolar sequestration revealed by P-31 NMR. *Pest Management Science*, 67:1215–1221.
- Ghanizadeh H. et al. (2016) Restricted herbicide translocation was found in two glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) populations from New Zealand. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2016; 18: 1041–1051.
- Ghanizadeh H. et al. (2017) Restricted herbicide translocation was found in two glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) populations from New Zealand. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18:1041–1051.
- Gomes et al. (2015) Extraction and simultaneous determination of glyphosate, AMPA and compounds of the shikimic acid pathway in plants. *Planta Daninha*, 33:295-304.
- Iwakami, S. et al. (2019) CYP81A P450s are involved in concomitant cross-resistance to acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase herbicides in *Echinochloa phyllopogon*. *New Phytologist*, 221, 2112–2122.
- Jugulam, M. & Shyam C. (2019) Non-target-site resistance to herbicides: Recent developments. *Plants*, 8:1-16.

- Kaundun S.S. et al. (2008) Importance of the P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in a goosegrass (*Eleusine indica*) population from the Philippines. *Weed Science*, 56:637-46.
- Kuk, Y.I. et al. (1999) Mechanism of fenoxaprop resistance in an accession of smooth crabgrass (*Digitaria ischaemum*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 64:112-123.
- Leach, G. E. et al. (1995) Target enzyme-based resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in *Eleusine indica*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 51:129-136.
- McCullough P.E. et al. (2016) First report of ACCase-resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in the United States. *Weed Science*, 64:399-408.
- Pan L. et al. (2019) Aldo-keto reductase metabolizes glyphosate and confers glyphosate resistance in *Echinochloa colona*. *Plant Physiology*, 181:1519-1534.
- Pan L. et al., (2021) An ABCC-type transporter endowing glyphosate resistance in plants. *PNAS*, 118: e2100136118
- Powles, S.B. & Preston, C. (2006) Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. *Weed Technology*. 20:282-289.
- Powles, S.B. & Yu, Q. (2010) Evolution in action: plants resistant to herbicides . *Annual Review of Plant Biology*, 61:317-34.
- Sammons, D. R., and Gaines, T. A. (2014) Glyphosate resistance: state of knowledge. *Pest Management Science*. 70, 1367–1377.
- Shaner, D.L. (2009) Role of translocation as a mechanism of resistance to Glyphosate. *Weed Science*, 57:118-123.
- Takano H.K. et al. (2018) Proline-106 EPSPS Mutation imparting glyphosate resistance in goosegrass (*Eleusine indica*) emerges in South America. *Weed Science*, 67:48-56.
- Tal, A. et al. (1996) Fenoxaprop-p resistance in *Phalaris minor* conferred by an insensitive Acetyl-Coenzyme A Carboxylase. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 56:134-140.
- Tani E.; Chachalis D. & Travlos I.S. (2015) A glyphosate resistance mechanism in *Conyza canadensis* involves synchronization of EPSPS and ABC-transporter genes. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33:1721–1730.
- Vázquez-García et al. (2021) Multiple herbicide resistance evolution: The case of *Eleusine indica* in Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69:1197–1205.

Vemanna R.S. et al. (2017). Aldo-keto reductase enzymes detoxify glyphosate and improve herbicide resistance in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 15: 794-804.

Vila-Aiub M.M. et al. (2012) Glyphosate resistance in perennial sorghum (*Sorghum halepense*) endowed by reduced glyphosate translocation and leaf uptake. *Pest Management Science*, 62:430-436.

Wang, C.S. (2017) Metabolism of fluazifop-p-butyl in resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in Taiwan. *Weed Science*, 65:228-238.

Wang, H. et al. (2013) The role of cytochrome P450 monooxygenase in the different responses to fenoxaprop-P-ethyl in annual bluegrass (*Poa annua* L.) and short awned foxtail (*Alopecurus aequalis* Sobol.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107:334-42.

Yuan J.S. et al. (2010) Functional genomics analysis of horseweed (*Conyza canadensis*) with special reference to the evolution of non-target-site glyphosate resistance. *Weed Science*, 58: 109–117.

Yuan, J.S.; Tranel, P.J. & Stewart, C.N. (2007) Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends Plant Science*, 12:6-13.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mutação Asp2078Gly foi responsável resistência cruzada aos inibidores da ACCase, sem superexpressão ACCase e/ou alterações nos processos de absorção e translocação de fenoxaprop-p-ethyl.

A superexpressão da EPSPs, as mutações Thr102 e P106 e as alterações na absorção e translocação não estão envolvidas na resistência de capim-pé-de-galinha ao glyphosate.

Mecanismos *non-target-site-resistance* envolvendo o glyphosate merecem novos estudos para elucidar o destino do herbicida nas plantas resistentes de capim-pé-de-galinha.