

DIVERSIDADE DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AO GLIFOSATO EM BIÓTIPOS DE CAPIM-ARROZ

Leonardo Vicente Ellert Kroth¹, Estéfani Sulzbach², Othon Dias dos Santos³, Leonardo Martins⁴, Catarine Markus⁵

Palavras-chave: *Echinochloa* spp., expressão do gene *EPSPS*, número de cópias, metabolização, mutação no local alvo.

Introdução

A resistência de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) ao herbicida glifosato (inibidor da 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintase – EPSPS) tem gerado preocupação devido à importância desse herbicida nos sistemas agrícolas do Brasil (Alarcón-Reverte et al., 2013; Heap, 2025). Além disso, há percepções de escape de biótipos da espécie *E. colona* ao glifosato no sul do país. Tradicionalmente, o capim-arroz era encontrado predominantemente em áreas de cultivo de arroz. No entanto, atualmente, essas espécies têm aumentando a sua ocorrência também em áreas de sequeiro, cultivadas com soja e milho, onde o uso de glifosato possui papel fundamental no manejo de plantas daninhas (Sulzbach et al, em preparação). Além disso, existe a percepção de que as condições ambientais de campo próximas a aplicação do glifosato afetam o nível de resistência do capim-arroz resistente a esse herbicida. Este estudo teve como objetivos: 1) comprovar a resistência de biótipos de *E. colona* ao glifosato; 2) avaliar o efeito da temperatura nos fatores de resistência (FR); 3) identificar os mecanismos de resistência de biótipos de capim-arroz (*E. colona* e *E. crus-galli*) oriundos de diferentes áreas de cultivo, terras baixas e coxilhas, com resistência ao herbicida glifosato.

Material e Métodos

As populações resistentes R1, R2, R3 e R4 foram coletadas nos municípios de Anta Gorda, Teutônia, Vale Verde e Itaqui/RS, respectivamente, em lavouras de soja/milho (R1-R3) e arroz (R4) entre 2019-2021, enquanto as suscetíveis (S1 e S2) foram obtidas em áreas próximas. A confirmação das espécies foi realizada através de análise molecular e morfológica. As sementes foram submetidas a superação da dormência com H_2SO_4 . As plantas foram cultivadas em casa de vegetação climatizada ($28^{\circ}C \pm 3^{\circ}C$; $500-600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; fotoperíodo 14h/10h) e no estágio de quatro folhas foram tratadas com glifosato (0 ou 1.080 g ha^{-1}) em câmara de pulverização automatizada (volume de calda de 200 L ha^{-1} e pontas de pulverização TJ8002E). As plantas sobreviventes a 1.080 g ha^{-1} aos 28 dias após o tratamento (DAT) foram crescidas e autopolinizadas, sua progênie foi submetida a curva de dose resposta, para a comprovação da resistência. O fator A foi composto de seis populações de capim-arroz; o fator B pelas temperaturas $25/20^{\circ}C$ e $35/30^{\circ}C$ e; o fator C por doses de glifosato de 0 a 2160 g ha^{-1} (S1 e S2), 0 a 4320 g ha^{-1} (R3 e R4) e 0 a 8640 g ha^{-1} (R1 e R2). As variáveis avaliadas foram controle visual, massa fresca e seca da parte aérea aos 28 DAT. Os dados foram submetidos à ANOVA e regressão log-logística ($p \leq 0,05$).

Para a identificação dos mecanismos de resistência foram verificados a ocorrência de mecanismos relacionados ao local de ação (RELA) e não relacionados (N-RELA): a) os fragmentos do gene *EPSPS* foram sequenciados após extração de DNA (protocolo CTAB modificado); b) O número de cópias de *EPSPS* foi quantificado via qPCR; c) A expressão gênica foi realizada 24 horas após tratamento (HAT) sob diferentes temperaturas, extraiu-se RNA, sintetizou-se cDNA e realizou-se qPCR com genes alvo (*EPSPS*, *EcAKR4*, *EcAKR4C9*, *EcAKR4C10*, *ABCC8*) e de referência *EiF4B* e *GAPDH* (Pan et al., 2019).

¹ Estudante de graduação em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 7712 – leonardovkroth@gmail.com

² Eng^a Agr^a Ma^a, Aluna de doutorado no Programa de Pós Graduação em Fitotecnia da UFRGS – estefanisulzbach@gmail.com

³ Estudante de graduação em Agronomia da UFRGS – othondiasdossantos@outlook.com

⁴ Farmacêutico, Aluno de mestrado no Programa de Pós Graduação em Fitotecnia da UFRGS – 00596068@ufrgs.br

⁵ Eng^a Agr^a Dr^a, Professora Adjunta, Departamento de Plantas de Lavoura, UFRGS – catarine.markus@ufrgs.br

Resultados e Discussão

As análises molecular e morfológica indicaram que as populações S1, R1, R2 e R3 pertencem à espécie *E. crus-galli* e as populações S2 e R4 pertencem à espécie *E. colona* (dados não apresentados). Os valores de ED50 a 25/20°C para S1, R1, R2 e R3 foram 303,6; 1123,9; 1192,8 e 608,8 g ha⁻¹, respectivamente, enquanto a 35/30°C foram 339,1; 2553,7; 2564,6 e 1272,1 g ha⁻¹. Isso indica que R1, R2 e R3 foram 7,5; 7,6 e 3,7 vezes menos sensíveis a 35/30°C comparado a 25/20°C (Tabela 1). Os GR50 para massa fresca e seca da parte aérea das plantas também foram maiores a 35/30°C. O FR para as populações resistentes variaram com a temperatura (Figuras 1A e 1C, Tabela 1), sendo esta variação associada à mutação Pro106 em *E. colona* (Han et al., 2016) e possivelmente a proteínas metabólicas e de transporte (Pan et al., 2021, 2019). A populações R4 exigiu dose duas vezes maiores para o controle eficaz a 35/30°C, enquanto S2 não foi impactado pela temperatura (Tabela 1). Este estudo comprova a resistência ao glifosato em população de *E. colona* no Brasil.

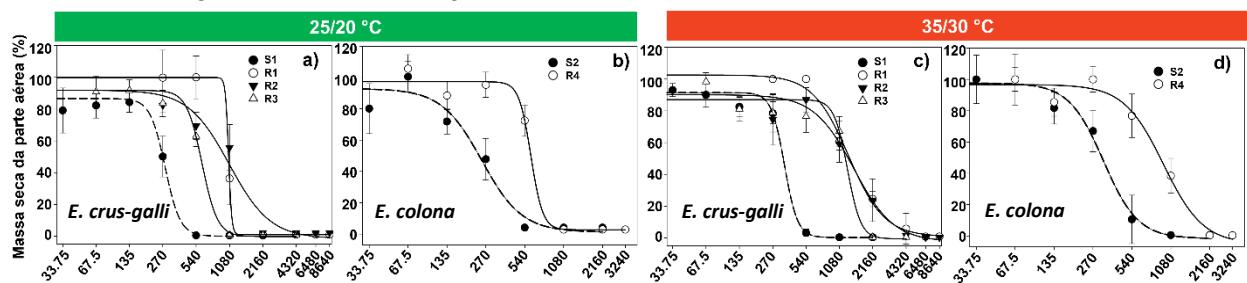


Figura 1. Massa fresca e seca da parte aérea (%) de *E. crus-galli* S1, R1, R2 e R3 (A e C) e *E. colona* S2 e R4 (B e D) em relação à testemunha não tratada, em doses crescentes de glifosato, aplicadas sob temperaturas de 25/20°C (A e B) e 35/30°C (C e D).

Tabela 1. Parâmetros da equação logística e fatores de resistência (FR) das variáveis controle, massa fresca e seca da parte aérea aos 28 dias após os tratamentos (28 DAT) com glifosato em temperaturas de 25/20°C e 35/30°C. S1, R1, R2 e R3 são populações *E. crus-galli*, S2 e R4 são populações *E. colona*.

Pop	e (ED50)	Temperatura 25/20 °C			Temperatura 35/30 °C			
		ED50 Limite inferior	ED50 Limite superior	FR	ED50 Limite inferior	ED50 Limite superior	FR	
<i>E. crus-galli</i> aos 28 DAT								
Controle								
S1	303.6	213.8	393.4	339.1	311.4	366.8		
R1	1123.9	1095.6	1152.3	3.7*	2553.7	2203.3	2904.1	
R2	1192.8	766.1	16.19.4	3.9*	2564.6	2282.2	2847.1	
R3	608.8	450.4	757.2	2.0*	1272.1	674.8	1869.4	
Massa fresca da parte aérea								
S1	297.7	133.9	459.5	319.8	282.2	406.5		
R1	989.8	862.9	1116.7	3.3*	1228.0	800.7	1656.4	
R2	1242.9	1086.8	1399.1	4.2*	1635.1	1393.5	1876.8	
R3	618.0	446.2	789.9	2.1*	1292.8	554.8	2030.7	
Massa seca da parte aérea								
S1	283.6	257.8	309.0	344.4	282.2	406.5		
R1	1025.6	460.8	1590.3	3.6*	1280.9	911.4	1650.5	
R2	1076.0	787.8	1364.2	3.8*	1451.0	911.4	1692.2	
R3	610.5	521.6	699.5	2.2*	1277.1	946.7	1607.6	
<i>E. colona</i> aos 28 DAT								
Controle								
S2	303.7	285.5	321.9	342.6	282.4	402.9		
R4	628.7	534.2	723.1	2.1*	1267.2	1060.3	1474.1	
Massa fresca da parte aérea								
S2	281.5	241.7	321.3	302.9	225.4	380.4		
R4	620.9	445.7	796.1	2.0*	869.2	759.1	979.2	
Massa seca da parte aérea								
S2	250.9	192.8	308.9	277.1	191.2	363.0		
R4	603.9	348.8	859.0	2.4*	809.5	673.5	945.6	

O sequenciamento confirmou mutação no gene alvo nas populações R3 e R4 (substituição Pro106Ser e Pro106Ala, respectivamente) (Figura 2D e 2F). As substituições na

Pro106 (Ser, Thr, Leu) geralmente conferem baixos níveis de resistência (RF=2-10) em várias espécies (Han et al., 2016). A substituição Pro106Ala está associada a FRs de 2,3-3,8 em *Eleusine indica* (Chen et al., 2021) e foi relatada pela primeira vez em *Echinochloa* em 2025. Em alohexaplóides como *E. crus-galli* e *E. colona*, mutações únicas podem resultar em baixo FR devido à expressão de múltiplas cópias do *EPSPS*, similar a *Avena fatua* (Yu e Powles, 2014). As populações R1 e R2 não apresentaram mutações no gene *EPSPS* e tiveram RFs entre 4-7, que foram influenciados pela temperatura, sugerindo mecanismos NRELA ou variação no número de cópias.

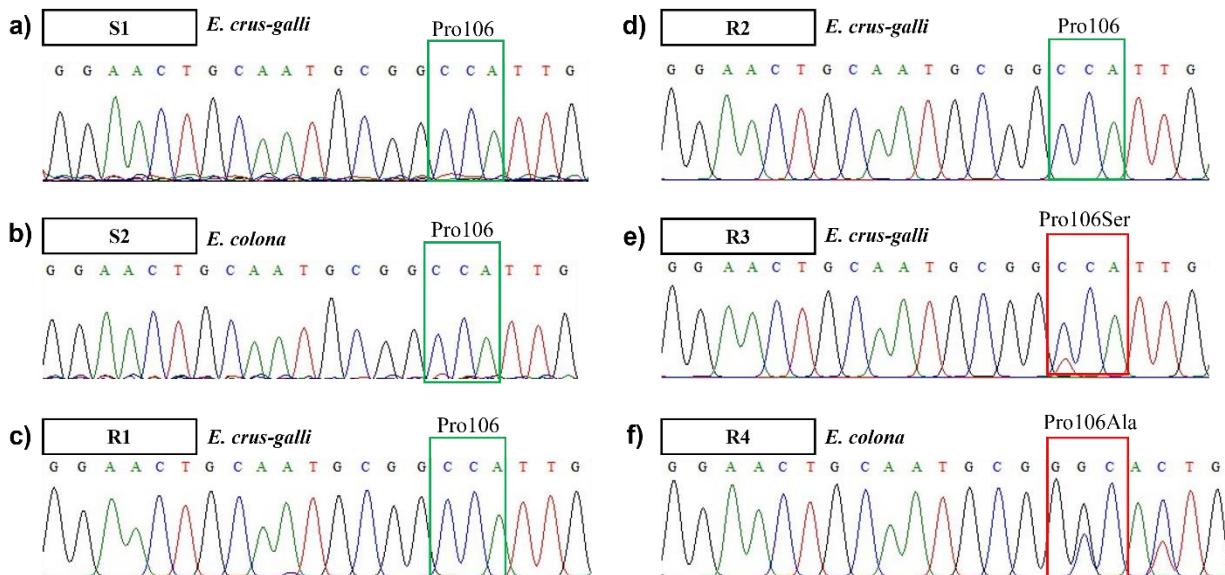


Figura 2. (A e B) Cromatograma das populações suscetíveis (S1 e S2) sem mutação no gene *EPSPS*; (E e F) Populações R3 e R4 com a substituição de aminoácidos Pro-106-Ser e Pro-106-Ala, respectivamente, na enzima *EPSPS*; (C e D) Populações resistentes (R1 e R2) sem a presença de mutação.

Com relação ao número de cópias do *EPSPS* não houve diferença estatística entre as populações de *E. crus-galli* R1, R2, R3 quando comparadas a população suscetível (S1) (Figura 3A). A população de *E. colona* R4 apresentou 1,9 cópias a mais que a população suscetível (S2), no entanto, isso não refletiu em aumento da expressão do gene *EPSPS* (Figura 3B). Variações no número de cópias conferindo resistência foram documentadas em outras espécies (Sulzbach et al., 2024) mas não foram relatadas em populações resistentes de *Echinochloa*. Assim, RELA foi confirmada em R3 e R4, enquanto NRELA é provável para R1 e R2.

A expressão de *EcAKR4*, *EcAKR4C9*, *EcAKR4C10* e *ABCC8* foi similar entre as populações suscetíveis e resistentes de ambas as espécies, com ou sem aplicação de glifosato (Figura 3). Estes genes estão associados a mecanismos NRELA. Os genes *AKRs* metabolizam o glifosato em um metabólito menos tóxico, o ácido aminometilfosfônico (AMPA) (Pan et al., 2019), enquanto *ABCC* bombeia o glifosato para fora das células (Pan et al., 2021). Além disso, mecanismos múltiplos (RELA + NRELA) podem coexistir em um único biótipo resistente de *E. colona* (Pan et al., 2019, 2021). A rápida seleção de R1 e R2 (*E. crus-galli*) no sul do Brasil, sem mecanismo identificado, sugere a necessidade de outros estudos com foco em resistência NRELA, como a recente associação de *CYP71AK44* à resistência em *E. indica* (He et al., 2024), desafiando a visão de metabolismo limitado de glifosato em plantas (Duke, 2019).

Conclusões

Este estudo confirmou a resistência de biótipos de *Echinochloa colona* ao herbicida glifosato, evidenciando variações nos fatores de resistência (FR) influenciadas pela temperatura, especialmente nos biótipos R1 e R2, que apresentaram maiores FR e possível resistência não relacionada ao local de ação (NRELA). Em contrapartida, os biótipos R3 e R4 demonstraram resistência do tipo RELA, associada a mutações no gene *EPSPS* (Pro106Ser e Pro106Ala). Esses resultados indicam que populações de *E. colona* e *E. crus-galli* oriundas de terras baixas

e coxilhas no sul do Brasil não compartilham os mesmos mecanismos de resistência, sugerindo processos evolutivos distintos influenciados pelas diferentes pressões de seleção e práticas de manejo nessas regiões. A identificação de mecanismos ainda não elucidados nos biótipos NRELA aponta para a necessidade de aprofundar os estudos sobre resistência metabólica e por transporte. Além disso, a influência da temperatura na eficácia do controle com glifosato reforça a importância de considerar fatores ambientais para as áreas que apresentam esses mecanismos de resistência a herbicidas. Assim, os resultados obtidos sustentam a necessidade de estratégias específicas e regionais de controle de capim-arroz, além de contribuir para o direcionamento de futuras pesquisas sobre os mecanismos moleculares envolvidos na resistência ao glifosato.

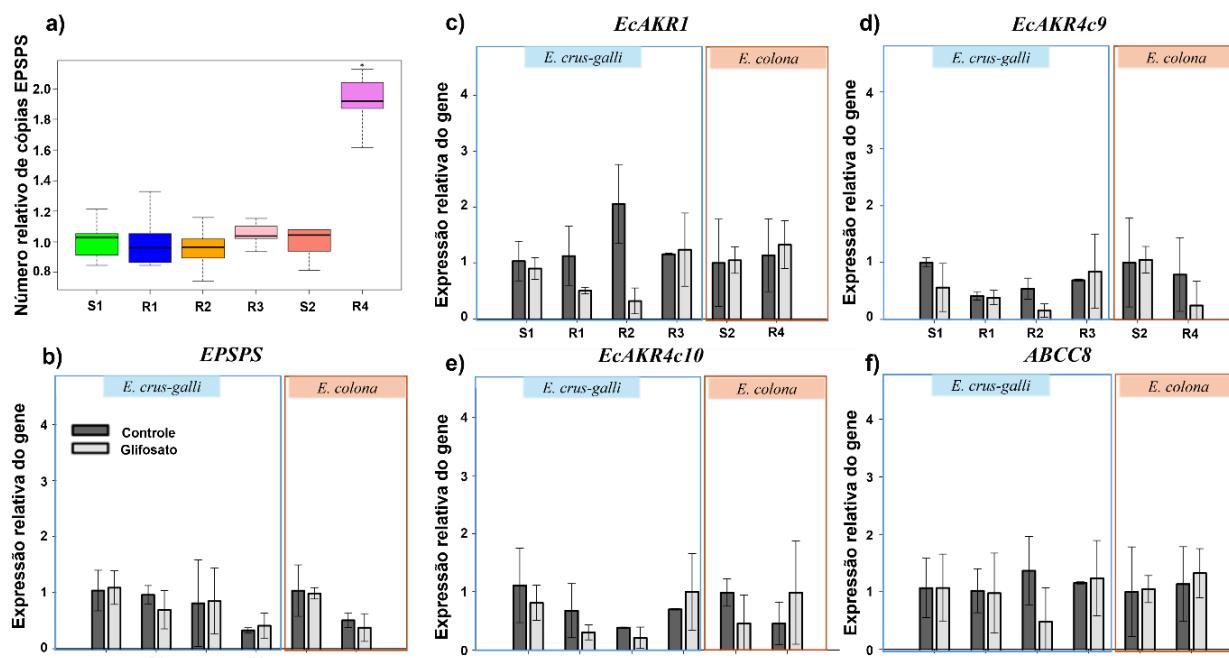


Figura 3. (A) Número relativo de cópias do *EPSPS* em populações suscetíveis (S1 e S2) e resistentes (R1, R2, R3 e R4). (B) Expressão do gene *EPSPS*, (C) *AKR1*, (D) *EcAKR4c9*, (E) *EcAKR4c10* e (F) *ABCC8* em populações suscetíveis (S1 e S2) e resistentes (R1, R2, R3 e R4) 24 horas após a aplicação do glifosato.

Referências

Alarcón-Reverte, R., García, A., Urzúa, J., and Fischer, A.J. (2013) Resistance to Glyphosate in Junglerice (*Echinochloa colona*) from California. *Weed sci.* 61: 48–54.

Chen, J., Wei, S., Huang, H., Cui, H., Zhang, C., and Li, X. (2021) Characterization of glyphosate and quizalofop-p-ethyl multiple resistance in *Eleusine indica*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 176: 104862.

Duke, S.O. (2019) Enhanced Metabolic Degradation: The Last Evolved Glyphosate Resistance Mechanism of Weeds? *Plant Physiol.* 181: 1401–1403.

Han, H., Yu, Q., Widderick, M.J., and Powles, S.B. (2016) Target-site EPSPS Pro-106 mutations: sufficient to endow glyphosate resistance in polyploid *Echinochloa colona* ?: Target-site EPSPS mutations in polyploid *Echinochloa colona*. *Pest Manag Sci.* 72: 264–271.

He, S., Tian, J., Ouyang, Y., Liao, Y., Yu, Q., Bai, L., et al. (2024) Glyphosate Resistance in *Eleusine indica*: Involvement of CYP71AK44 in Addition to EPSPS Gene Overexpression. *J Agric Food Chem.* 72: 23758–23765.

HEAP, I. The international survey of herbicide resistant weeds. Disponível em <<http://www.weedscience.com>>; acesso dia 14 fevereiro de 2025.

Pan, L., Yu, Q., Han, H., Mao, L., Nyporko, A., Fan, L., et al. (2019) Aldo-keto Reductase Metabolizes Glyphosate and Confers Glyphosate Resistance in *Echinochloa colona*. *Plant Physiol.* 181: 1519–1534.

Pan, L., Yu, Q., Wang, J., Han, H., Mao, L., Nyporko, A., et al. (2021) An ABCC-type transporter endowing glyphosate resistance in plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 118: e2100136118.

Sulzbach, E., Turra, G.M., Cutti, L., Kroth, L.V.E., Tranell, P.J., Merotto, A., et al. (2024) Smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*) and unresolved *Amaranthus* spp. from Brazil resistant to glyphosate exhibit the EPSPS TAP-IVS substitution. *Weed Sci.* 72: 48–58.

Yu, Q., and Powles, S. (2014) Metabolism-Based Herbicide Resistance and Cross-Resistance in Crop Weeds: A Threat to Herbicide Sustainability and Global Crop Production. *Plant Physiology*. 166: 1106–1118.