

## RESISTÊNCIA DE *AMARANTHUS HYBRIDUS* AOS HERBICIDAS INIBIDORES DE ACETOLACTATO SINTASE

PEDRO AUGUSTO S. D. BACELAR<sup>1</sup>; ADRIANA A. DO AMARANTE<sup>2</sup>; MAICON FERNANDO SCHMITZ<sup>3</sup>; GIOVANA M. ROBE<sup>4</sup>; DIRCEU AGOSTINETTO<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – pedro\_bacelar81@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – 19dricaa@gmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas - maicon\_schmitz@hotmail.com

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas - giovanamilechrobe@gmail.com

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas – agostinnetto.d@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

As espécies de caruru competem com a soja por recursos essenciais como água, luz e nutrientes. Seu controle é baseado principalmente no método químico, por sua praticidade, eficiência e ergonomia. Entretanto, os herbicidas são agentes selecionadores e a aplicação indiscriminada de um único mecanismo de ação em alta frequência leva à alta pressão de seleção, favorecendo a seleção de biótipos resistentes (AGOSTINETTO; VARGAS, 2014).

Dentre os herbicidas mais utilizados no mundo estão os inibidores de acetolactato sintase (ALS), herbicidas com maior número de casos de resistência no mundo (HEAP, 2023). O primeiro caso de caruru resistente aos inibidores da ALS no mundo data de 1991, com as espécies *A. blitoides* e *A. retroflexus*. Desde então já foram registrados 95 casos, em 9 espécies (*A. blitoides*, *A. blitum*, *A. hybridus* / *quitensis*, *A. palmeri*, *A. powellii*, *A. retroflexus*, *A. spinosus*, *A. tuberculatus* e *A. viridis*) (HEAP, 2023). O principal mecanismo de resistência adquirido pelas espécies de caruru para os herbicidas desta classe são mutações em diferentes locais da enzima, que ocasionam diferentes níveis de resistência a cada um dos grupos químicos (MILANI et al., 2019).

Considerando a importância de se conhecer os mecanismos de resistência aos herbicidas para elaborar estratégias de manejo, objetivou-se com esse trabalho confirmar a resistência cruzada aos inibidores da ALS e confirmar os mecanismos que conferem essa resistência.

### 2. METODOLOGIA

Os estudos de resistência de caruru aos herbicidas inibidores da ALS foram conduzidos em duas etapas: (1) curva dose-resposta com os herbicidas chlorimuron (sulfoniluréia) e imazethapyr (imidazolinonas); (2) sequenciamento da enzima ALS. A metodologia de ambos experimentos está descrita abaixo.

#### 2.1 Curva dose-resposta para confirmação da resistência

Foram realizados dois experimentos de curva dose resposta, sendo o primeiro com o herbicida chlorimuron e o segundo com o herbicida imazethapyr, em delineamento inteiramente casualizado em arranjo bifatorial 2x8, onde o fator A corresponde aos biótipos [suscetível (B1) e resistente (B27)] e o fator B às doses de cada herbicida. As doses aplicadas foram: chlorimuron - 0, 2,5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 g i.a ha<sup>-1</sup> e; imazethapyr - 0, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 g i.a. ha<sup>-1</sup>. A aplicação foi realizada quando as plantas apresentavam de 4-6 folhas, com auxílio de pulverizador costal, com volume de aplicação de 150 L ha<sup>-1</sup>.

O controle visual foi avaliado aos 28 dias após a aplicação (DAA), atribuindo-se notas de 0 (ausência de sintomas) a 100 (planta morta). A parte aérea foi coletada e pesada para calcular a redução da massa seca da parte aérea (MSPA).

Os dados foram avaliados quanto à normalidade e homocedasticidade e submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,05$ ). Em caso de significância foi realizada análise de regressão sigmoidal do tipo logístico, conforme segue:

$$y = a / [1 + (x / x_0)^b]$$

onde:  $y$  = % de controle ou de redução da MSPA;  $x$  é = dose do herbicida; e  $a$ ,  $x_0$  e  $b$  são os parâmetros da equação, sendo  $a$  = diferença entre os pontos máximo e mínimo da curva,  $x_0$  = dose que proporciona 50% de resposta da variável e  $b$  é a declividade da curva. A partir dos valores de  $C_{50}$  e  $GR_{50}$  foram obtidos os fatores de resistência para cada combinação do biótipo resistente e suscetível, dividindo-se  $C^{50}$  e  $GR^{50}$  do biótipo resistente pelo suscetível.

## 2.2 Sequenciamento da enzima ALS

Para esse experimento, sementes de duas plantas de caruru de cada biótipo foram coletadas e foi feita extração do DNA com metodologia CTAB modificada. O gene ALS foi amplificado usando quatro primers específicos para conseguir abranger todas as regiões da ALS com mutações conhecidas que conferem resistência. Os primeiros foram: (1): F: TCCTCCGCCGCCCTCTTCAAAT R: AGCACCTGGACCAGAAGTGGCA; (2) F: GGGGTTTTTCGCTGCTGAAGGCT R: GGCTAGCAAACGCCTCGAGCTT; (3) F: TGTTGGGAATGCACGGGACTGT R: ACAACCGCATCGCCCTTCGT; (4) F: TGGCTGACCTCGGGTGGTTT R: AGGCAGCACATGCTCCTGATGT. As condições de ciclagem variaram conforme o primer. Os produtos purificados foram enviados para sequenciamento e posteriormente foi feita análise da sequência da enzima para detecção de mutações.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados cumpriram os requisitos para o teste de normalidade e homocedasticidade, não precisando ser transformados. Para os herbicidas chlorimuron e imazethapyr a análise demonstrou interação entre os fatores testados (biótipos x doses), tanto para controle aos 28 DAA quanto para redução da MSPA (Figura 1). Para todas as variáveis os resultados se ajustaram ao modelo sigmoidal de três parâmetros.

Para o biótipo suscetível (B1), o controle aos 28 DAA de ambos os herbicidas, observou-se já na menor dose testada, controle superior a 80%, indicando a alta sensibilidade (Figura 1a-b). O elevado controle já com 1/8 da dose recomendada em bula para os dois herbicidas também é indicativo de baixo valor de  $C_{50}$  para este biótipo (Tabela 1). A dose de registro de chlorimuron (20 g i.a. ha<sup>-1</sup>) e de imazethapyr (106 g i.a. ha<sup>-1</sup>) proporcionaram controle médio de 94,5 e 99% respectivamente.

Para o biótipo suspeito de resistência (B27), observou-se que, a partir das doses de registro de ambos herbicidas, o controle tendeu à estabilidade, não havendo acréscimo significativo nos valores de controle à partir destas doses (Figura 1a-b). Observou-se também que, mesmo na maior dose testada, equivalente a 8x a dose de registro, os biótipos não alcançaram 50% de controle, mantendo-se em 34% para chlorimuron e 43,3% em imazethapyr. O fato impossibilita o cálculo preciso dos FRs (Tabela 1).

Para análise de redução da MSPA, verificou-se resposta variável tanto entre os biótipos quanto para os herbicidas testados (Figura 1c-d). Observou-se que para

o biótipo suscetível (B1), já na menor dose testada de ambos herbicidas, a redução foi próxima a 100%. Já para o biótipo resistente (B27), quando avaliada a redução proporcionada por chlorimuron, observou-se controle superior a 60% quando utilizada 8 vezes a dose, enquanto que para imazethapyr, a curva estabilizou-se à partir da dose de registro, não havendo incremento significativo e com redução média de 47% .

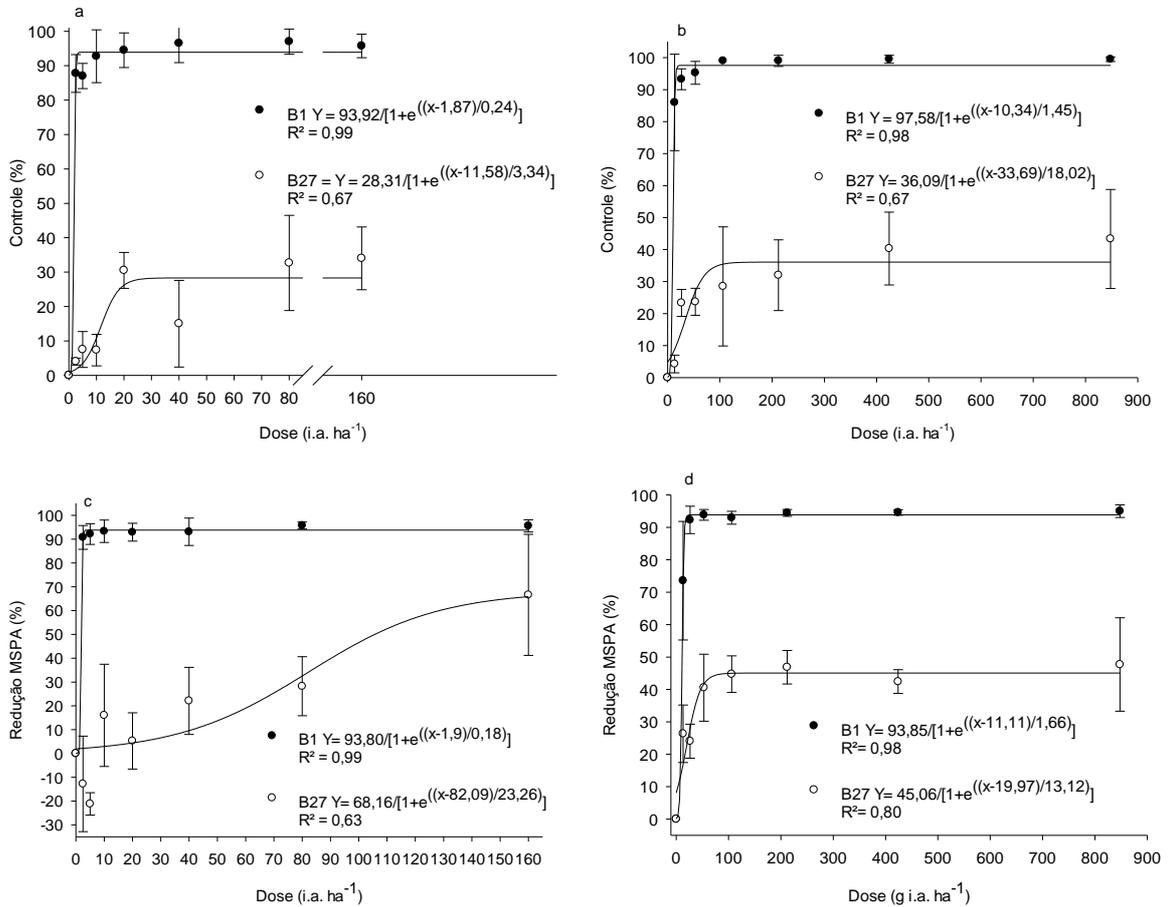


Figura 1: Controle (%) (a, b) e redução do acúmulo de MS (%) (c, d) aos 28 dias após a aplicação de doses crescentes dos herbicidas chlorimuron (a,c) e imazethapyr (b,d) em biótipos de caruru aplicados com os herbicidas. FAEM/UFPEL, Capão do Leão, 2023.

**Tabela 1** - Valores da dose necessária para promover 50% de controle (C<sub>50</sub>) e 50% de redução da massa seca (GR<sub>50</sub>) de gerações de caruru em resposta à aplicação de diferentes doses dos herbicidas chlorimuron e imazethapyr. FAEM/UFPEL, Capão do Leão, 2023.

Biótipo	C <sub>50</sub> (g i.a. ha <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	FR <sup>2</sup>	GR <sub>50</sub> (g e.a. ha <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	FR <sup>2</sup>
<b>Chlorimuron</b>				
1	1,902	-	1,924	-
27	>160,0	>84,12	105,7	54,93
<b>Imazethapyr</b>				
1	10,415	-	11,33	-
27	>848	>81,42	>848	>74,85

<sup>2</sup> FR: Fator de resistência; <sup>3</sup> GR 50 relativo à variável massa seca aos 28 DAA.

A sobrevivência das plantas do biótipo 27 após exposição à máxima dose recomendada dos herbicidas, bem como os fatores de resistência apresentados, confirmam a resistência cruzada dos biótipos aos herbicidas inibidores da ALS

(Figura 1; Tabela 1). Vale ressaltar que as curvas apresentadas foram realizadas com plantas provenientes da primeira geração dos biótipos coletados a campo, confirmando a herdabilidade da característica, um dos critérios para confirmação da resistência.

Para elucidação do mecanismo de resistência do biótipo estudado, o sequenciamento de DNA confirmou a presença de uma mutação simples no gene codificador da enzima ALS, onde uma guanina foi substituída por uma timina, alterando o códon formador do aminoácido. Com essa substituição, houve mudança na estrutura primária da proteína, havendo a substituição de um triptofano por uma leucina na posição 574 da proteína (Trp574Leu).

Essa mutação na posição 574 foi relatada anteriormente na literatura, podendo, além da Leu, haver a substituição por Gly, Met, Arg (CASALE; GIACOMINI; TRANEL, 2019). Dessas, há registro de resistência cruzada a sulfoniluréias e imidazolinonas unicamente para Trp574Leu e Trp574Arg, sendo a primeira substituição a mais comum das relatadas, sendo observada em 36 espécies (CASALE; GIACOMINI; TRANEL, 2019).

Corroborando com os altos níveis de resistência encontrados neste estudo, a mesma substituição observada promoveu níveis de resistência superiores a 900 vezes em biótipo de *A. retroflexus* (MCNAUGHTON et al., 2005).

#### 4. CONCLUSÕES

O biótipo de *Amaranthus hybridus* é resistente aos herbicidas inibidores de ALS, sendo a resistência decorrente da substituição simples Trp574Leu.

A mutação confere resistência cruzada aos grupos das sulfoniluréias e imidazolinonas, com fatores de resistência C50 acima de 84,1 e 81,4 para o controle de chlorimuron e imazethapyr, respectivamente; e, fatores de GR50 de 54,9 e acima de 74,9, respectivamente.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. In: Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil. Pelotas: Editora UFPel, 2014. p.09-32.

CASALE, F.A.; GIACOMINI, D.A.; TRANEL, P.J. Empirical investigation of mutation rate for herbicide resistance. **Weed Science**, v.67, p.361-368, 2019.

HEAP, I. International Survey of Herbicide resistant Weeds. Disponível em: <<http://www.weedscience.org>> Acesso em: 10 mar. 2021.

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

MILANI, A.; SCARABEL, L.; SATTIN, M. A family affair: resistance mechanism and alternative control of three *Amaranthus* species resistant to acetolactate synthase inhibitors in Italy. *Pest management science*, v.76, p.1205-1213, 2019.