

MUTAÇÃO NO SÍTIO-ALVO HERBICIDA EXPLICA RESPOSTA DIFERENCIAL ENTRE BIÓTIPOS DE CAPIM-ANNONI (*Eragrostis plana*) AO MANEJO COM GLYPHOSATE

JÚLIA RAHIM NACHTIGALL¹; CAMILA DE OLIVEIRA LANGER²; ELSA KUHN KLUMB³; ANDRÉ ANDRES⁴; FABIANE PINTO LAMEGO⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – juliarnachtigall@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – camilalanger5998@gmail.com

³Embrapa Clima Temperado – elsakk91@yahoo.com.br

⁴Embrapa Clima Temperado – andre.andres@embrapa.br

⁵Embrapa Clima Temperado – fabiane.lamego@embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

O glyphosate é um herbicida de amplo espectro, não seletivo e sistêmico, amplamente utilizado no manejo de plantas daninhas em diferentes sistemas agrícolas (AMARANTE JR et al., 2001; POWLES; YU, 2010). O mecanismo de ação consiste na inibição da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), a qual atua na via do ácido shiquímico, bloqueando a síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais (fenilalanina, tirosina e triptofano) (AMRHEIN et al., 1980).

A utilização contínua e repetitiva de glyphosate, sem a rotação de mecanismos de ação, aumenta a pressão de seleção e como consequência, causa evolução para resistência ao herbicida, observada em gramíneas e dicotiledôneas anuais e perenes (HEAP, 2024). Os mecanismos de resistência aos herbicidas podem ser classificados naqueles relacionados ao alvo (Target-Site Resistance – TSR) e não relacionados ao alvo (Non-Target-Site Resistance – NTSR) (DÉLYE, 2013). TSR envolve alterações no gene ou na expressão da EPSPS, incluindo mutações pontuais que modificam a afinidade do herbicida pelo sítio ativo (POWLES; YU, 2010). A mutação mais comum descrita para resistência ao glyphosate é a substituição do aminoácido prolina na posição 106 (Pro106X), X equivalendo a leucina, serina, alanina ou treonina (BAERSON et al., 2002).

No capim-annoni, planta invasora perene de elevada rusticidade e disseminação no Bioma Pampa, a utilização do glyphosate é parte de programa de recuperação de pastagens degradadas ou da integração lavoura-pecuária, antecedendo a semeadura da soja (LAMEGO et al., 2020). Relatos recentes de falhas no controle da invasora (MACHADO et al., 2022) motivam a investigação de possíveis mecanismos de resistência, incluindo mutações na EPSPS. O sequenciamento parcial do gene da EPSPS é, portanto, uma ferramenta essencial para verificar a presença de alterações conhecidas. Deste modo, o objetivo deste trabalho é compreender a base molecular da resposta diferenciada ao herbicida entre biótipos de capim-annoni.

2. METODOLOGIA

Foi coletado tecido vegetal (folhas) de quatro plantas de capim-annoni definidas como AS1, AS2, AS3 e AS4 - com ausência de controle e as suscetíveis ao herbicida S1, S2, S3 e S4, conforme um estudo prévio, sendo armazenado em ultrafreezer a -80°C, no Laboratório de Biologia Molecular do CPACT. Posteriormente, o material foi utilizado para extração de RNA total a partir de protocolo PureLink™ Plant RNA Reagent (ThermoFisher Scientific), com modificações para a extração de capim-annoni.

O RNA extraído foi utilizado para a síntese de cDNAs, utilizando o kit comercial Super Script™ III Reverse Transcriptase (TermoFisher Scientific), conforme protocolo do kit.

Os primers utilizados para a amplificação parcial do gene da EPSPS de capim-annoni foram desenhados utilizando a ferramenta Primer Designing Tool (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Benchling. Para isso, a coding DNA sequence (CDS) do gene da enzima EPSPS, obtida do transcriptoma do capim-annoni (Lamego et al., 2022) foi utilizada como referência. Os primers desenhados foram: primer *forward* (F) 5'- GCCGACAAAGAGGCCAAAAG-3' e primer *reverse* (R) 5'-GCACCGAGCTGTTCAATCC-3', tendo como fragmento amplificado esperado o tamanho de 236 pb.

A amplificação parcial do gene foi realizada usando o Kit Taq Super Fi I (Invitrogen) com as seguintes concentrações no volume final da reação de 50ul: 2µL de cDNA, 10µL de Tampão (5X), 1µL de dNTPs (10mM), 2µL de Primer F e R (10µM), 1µL de Taq Super Fi I (2U/µL) e 32µL de água DEPC, em termociclador (Veriti Applied Biosystems), com as seguintes condições: 95°C por 30s, 40 ciclos de 95°C por 30s, 60°C por 20s e 72°C por 45s, com uma extensão final de 72°C por 5min. Uma alíquota dos produtos de PCR foi submetida a eletroforese em gel de agarose 2%, usando TBE 1X, Gelred e o marcador molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) e, posteriormente analisada em fotodocumentador Infinity (Vilber). Confirmada a presença do *amplicon* esperado, as reações de PCR foram submetidas para purificação e sequenciamento Sanger na empresa GenOne Biotech. As sequências obtidas foram alinhadas à sequência do gene da EPSPS de biótipos suscetíveis (KM387414.1, KM387415.1) e resistentes (KM387413.1; KM387412.1) de *Eleusine indica* depositadas no GenBank (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), assim como a sequência de EPSPS de capim-annoni (ainda não liberada publicamente). Foram utilizados os softwares Sequencher para gerar sequências *contig* das sequências *forward* e *reverse*, e, posteriormente alinhadas usando o software Mega X (KUMAR et al., 2018).

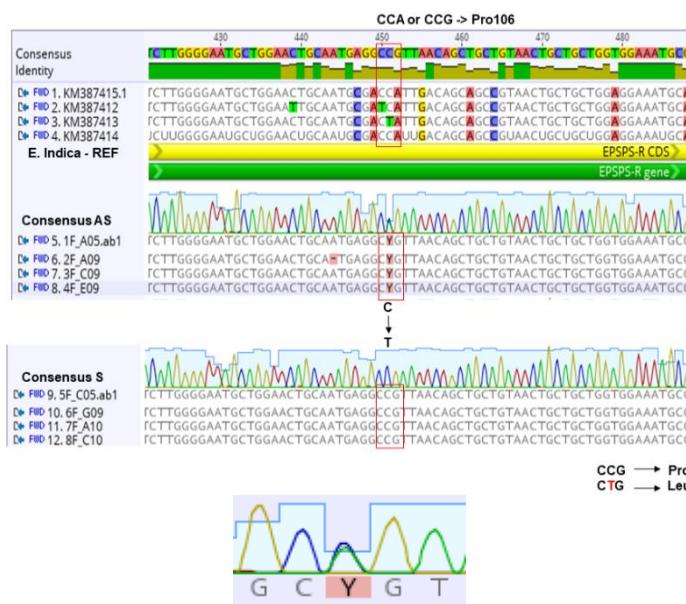
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sequenciamento parcial do gene da EPSPS resultou na obtenção de um fragmento de 236 pares de bases (pb). As sequências obtidas foram primeiramente analisadas usando a ferramenta BLAST do NCBI (www.ncbi.org), para verificação de sua correspondência ao gene da EPSPS. Após esta confirmação, sequências da EPSPS de *E. indica* (KM387413.1; KM387412.1; KM387415.1 e KM387414.1 (NCBI,) de biótipos suscetível e resistentes a glyphosate descritas por CHEN et al. (2015) foram utilizadas para verificação de mutação na posição 106, uma das principais responsáveis pela resistência ao herbicida.

As sequências *contig* geradas para o biótipo suscetível (S1, S2, S3 e S4), apresentam o aminoácido Prolina na posição 106, com o códon equivalente a CCG (Figura 1). Para o biótipo AS, as plantas analisadas apresentaram um pico duplo na posição 106, indicando haver dois possíveis alelos (Figura 1). A presença de um "Y" indica timina (T) ou citosina (C), onde o códon CCG corresponde a prolina; CTG, indica uma alteração para o aminoácido leucina, a qual caracteriza resistência ao herbicida, já reportada previamente na literatura (CHEN et al., 2023). Outras duas posições de mutação conhecidas para EPSPS (Thr102 e Leu103) foram analisadas, mas não foram vistas mutações nas populações investigadas.

A mutação identificada já foi amplamente descrita em espécies resistentes a glyphosate, como *Eleusine indica* (BAERSON et al., 2002; CHEN et al., 2015), sendo reconhecida como um dos principais mecanismos de resistência do tipo TSR, por reduzir a afinidade do glyphosate pelo sítio ativo da EPSPS (POWLES; YU, 2010). A ocorrência em heterozigose indica a presença simultânea de alelos mutado e não mutado, situação que pode conferir níveis intermediários de resistência em comparação a plantas em homozigose (GAINES et al., 2010). No capim-annoni, a detecção dessa alteração em todos os biótipos classificados como de ausência de controle, aliada à ausência de outras mutações no fragmento sequenciado, reforça a hipótese de que a mutação Pro106Leu seja a base molecular responsável pelas falhas de controle observadas (MACHADO et al., 2022). Assim, os resultados confirmam a relevância dessa alteração específica na EPSPS como fator determinante da ausência de controle ao glyphosate nessa espécie.

Figura 1 –Alinhamento de sequências gênicas parciais do gene da enzima EPSPS de biótipos de capim-annoni (S e AS) com sequências suscetível e resistente ao glyphosate de *Eleusine indica* (NCBI: KM387414 (S), KM387415.1(S), KM387412.1 (R) e KM387413.1 (R)). O alinhamento abrange a região de mutação associada a resistência ao glyphosate (Prolina 106).



4. CONCLUSÕES

O biótipo de capim-annoni AS, suspeito de resistência ao herbicida glyphosate, apresenta mutação pontual heterozigótica (CCA → CTA) na posição 106 do gene da enzima EPSPS, resultando na substituição de prolina por leucina, o que indica que a alteração no sítio alvo herbicida é a causa da falha de controle observada a campo e confirma a resistência.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE JR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. Glyphosate: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, São Paulo, v.24, n.4, p.683-693, 2001.

AMRHEIN, N.; SCHAB, J.; STEINRÜCKEN, H. C. The mode of action of the herbicide glyphosate. **Naturwissenschaften**, v.67, p.356–357, 1980.

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

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

CHEN, J.; LI, Z.; CUI, H.; YU, H.; LI, X. Gene amplification of EPSPS with a mutation in conserved region: The evolved glyphosate resistance mechanism in *Eleusine indica*. **Agronomy**, v. 13, n. 3, p. 699, 2023.

DÉLYE, C. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: A major challenge for weed science in the forthcoming decade. **Pest Management Science**, V.69(2), 176–187, 2013.

GAINES, T. A.; ZHANG, W.; WANG, D.; BUKUN, B.; CHISHOLM, S. T.; SHANER, D. L.; NISSEN, S. J.; PATZOLDT, W. L.; TRANEL, P. J.; CULPEPPER, A. S.; GREY, T. L.; WEBSTER, T. M.; VENCILL, W. K.; SAMMONS, R. D.; JIANG, J.; PRESTON, C.; LEACH, J. E.; WESTRA, P. Gene amplification confers glyphosate resistance in Amaranthus palmeri. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, V.107(3), 2010.

HEAP, I. **The International Herbicide-Resistant Weed Database**. 2024. Disponível em: <http://www.weedscience.org>. Acesso em: 14 ago. 2025.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol Biol Evol**. 35(6):1547–1549, 2018.

LAMEGO, F.P.; CARATTI, F.C.; BURGOS, N.R.; KLUMB, E.K.; DOMINGUES, R.; SILVA, F.R. Sequenciamento genômico de capim-annoni. **CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS**, 2022.

LAMEGO, F. P.; CARATTI, F. C.; PEREZ, N. B. Ocorrência de capim-annoni no banco de sementes do solo de áreas infestadas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v.46, Embrapa Pecuária Sul, Bagé, 2020.

MACHADO, Y. M. S.; POLINO, R. C.; HEPP, S. S.; BASTIANI, M. O.; LAMEGO, F. P. Investigação da eficiência de controle do capim-annoni por glyphosate: evolução para resistência ao herbicida?. **XII SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA PECUÁRIA SUL**, 2022.

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