

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Mecanismos de Resistência de Plantas Daninhas ao Glifosato em
Pomares de Citros no Estado de São Paulo**

Gabriel da Silva Amaral*

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientadora: Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva
Coorientador: Leonardo Bianco de Carvalho (UNESP)

***Bolsista CAPES**

São Carlos - SP
2024



Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Gabriel da Silva Amaral, realizada em 28/03/2024.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva (UFSCar)

Prof. Dr. Ricardo Alcántara de La Cruz (UFV)

Prof. Dr. Kassio Ferreira Mendes (UFV)

Prof. Dr. João Oiano Neto (EMBRAPA)

Prof. Dr. Airton Damasceno Silva (FCFRP/USP)

“O fim de uma viagem é apenas o começo de outra. É preciso ver o que não foi visto, ver outra vez o que se viu já, ver na primavera o que se vira no verão, ver de dia o que se viu de noite (...) É preciso voltar aos passos que foram dados, para repetir e para traçar caminhos novos ao lado deles. É preciso recomeçar a viagem. Sempre.”

José Saramago

À Deus, pois Ele tem me concedido força e sabedoria para enfrentar as dificuldades da vida. Dedico também aos meus pais, Miravaldo e Carmem, por serem mais que amigos nos momentos difíceis. Aos meus irmãos, todos os familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

Neste momento, gostaria de expressar minha profunda gratidão a Deus por me conceder a oportunidade de concluir esta etapa tão importante da minha jornada acadêmica.

Minha gratidão se estende à professora Dra. Maria Fátima. Desde que concordou em ser minha orientadora até o presente momento, ela tem sido não apenas uma mentora acadêmica, mas também uma verdadeira formadora de cidadãos. Palavras são insuficientes para descrever sua pessoa, mas certamente empatia, profissionalismo, carisma e respeito não podem ser esquecidos. Sinto um imenso orgulho por ter sido orientado por uma mulher tão brilhante, tanto profissional quanto pessoalmente.

Não posso deixar de agradecer ao Dr. Ricardo. Sem sua ajuda e incentivo, este trabalho não teria sido concluído. Em muitos momentos, ele me motivou, mostrou o caminho e me ensinou valiosas lições através dos erros. Sou imensamente grato por toda a colaboração e, principalmente, pela sua amizade.

Agradeço a todos os colegas e professores do laboratório de Produtos Naturais (PN) do Departamento de Química da UFSCar.

Expresso minha gratidão ao professor Dr. Flávio Henrique Silva por sua parceria ao ceder seu laboratório e, em especial, ao Eduardo cuja contribuição foi fundamental para a execução dos experimentos de Biologia Molecular. Também agradeço ao professor Dr. Fernando Azevedo e ao Dr. Rodrigo Martinelli pela colaboração na coleta de sementes e ao Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP).

Não poderia deixar de agradecer à Dra. Dorai Periotto Zandonai, por sempre se esforçar ao máximo para manter o laboratório funcionando. Também quero expressar meu sincero agradecimento à equipe de limpeza, cujo

trabalho é fundamental para o funcionamento do laboratório, assim como os vigilantes e toda a equipe de apoio, que tornam possível o ambiente de estudo e pesquisa.

Agradeço aos amigos que fiz em São Carlos. Acredito ser necessário mencionar alguns deles que, com certeza, me acolheram, motivaram e ajudaram, tornando essa jornada mais leve e feliz:

- Os membros da república Puxadinho dos baianos: Ívero, Analu e Herick;
- Adriel, por ter me dado a oportunidade de ser amigo e por muitas vezes me ajudar imensamente;
- A Aylanna e Jader e, principalmente, por me proporcionarem a oportunidade de ter uma afilhada linda, a Yanna;
- Aos colegas de moradia: Josi, Laila, Elenara e Julian;
- Aos amigos Renato, Alicia e Chrystiaine;
- Aos amigos da Bahia (Carini, Romario, Talita, Matheus, Jessica, Bruna, Nicolay, Patrick, Sidnei, Thaina, Joaquim, Anagéssica e tantos outros...)
- Aos amigos do Forró Caaso;

Agradeço também aos meus irmãos, Tiago, Tatiana e Elton, por sempre estarem ao meu lado me apoiando. A todos os meus familiares, especialmente aqueles que sempre me ampararam financeiramente no início desta jornada.

E finalmente, aos meus pais, Mirivaldo e Carmem, todo o meu reconhecimento. Eles sempre acreditaram em mim e, mesmo diante das dificuldades, sacrificaram-se para que eu pudesse alcançar este momento e receber este título. Sou profundamente grato por seu amor, apoio e dedicação.

A todos vocês, meu sincero e profundo sentimento de GRATIDÃO!

LISTA DE ABREVIACÕES

AE	Ácido equivalente
ALS	Acetolactato sintase
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
E4P	D-eritrose 4-fosfato
EPSPS	5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GR ₅₀	Redução da massa (<i>growth reduction to 50%</i>)
HAT	Horas após tratamento
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD ₅₀	Dose letal (<i>Lethal dose to 50%</i>)
I ₅₀	Inibição para 50%
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEP	Fosfoenolpiruvato
PIB	Produto Interno Bruto
RF	Fator de resistência
SECEX	Secretaria de Comércio Exterior
TPS	Proteína solúvel total
WSSA	<i>Weed Science Society of America</i>

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Identificação de populações de plantas daninhas com suspeita de resistência ao glifosato coletadas em diferentes pomares de citros do estado de São Paulo, Brasil.	22
TABELA 2. Doses médias eficazes de glifosato para reduzir o massa seca (GR ₅₀) e/ou a sobrevivência das plantas (LD ₅₀) em 50% nas plantas daninhas coletadas em pomares de citros do estado de São Paulo, Brasil.	29
TABELA 3. Parâmetros das equações sigmoidais ¹ utilizadas para estimar a dose média eficaz (g ea ha ⁻¹) de glifosato necessária para reduzir o peso fresco em 50% (GR ₅₀) e para causar mortalidade de plantas em 50% (LD ₅₀) em populações resistentes (R1, R2 e R-IAC) e suscetível (S-Lim) de caruru-de-mancha (<i>Amaranthus viridis</i> L.), coletadas em pomares de citros no estado de São Paulo, Brasil.	45
TABELA 4. Parâmetros das equações sigmoidais ¹ utilizadas para estimar a concentração de glifosato (µm) necessária para inibir a EPSPS em 50% (I ₅₀) em populações de caruru-de-mancha (<i>Amaranthus viridis</i> L.) resistentes e suscetíveis ao glifosato, coletadas em pomares de citros no estado de São Paulo, Brasil.	49
TABELA 5. Conjunto de primers utilizados	55
TABELA 6. Translocação de ¹⁴ C-glifosato das 12 às 72 horas após o tratamento (HAT) em plantas de populações de <i>A. Viridis</i> e <i>S. Americanum</i> suscetíveis e resistentes ao glifosato	64

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Mapa mundial dos casos de resistência ao glifosato.....	10
FIGURA 2. Evolução dos casos de resistência ao glifosato por espécies no mundo.....	10
FIGURA 3. Estrutura química do glifosato.	13
FIGURA 4. A via do chiquimato, a sua relação com outras vias metabólicas e o sítio da sua inibição pelo glifosato.	16
FIGURA 5. Curvas dose-resposta da porcentagem de mortalidade de plantas dentro de uma população de espécies de plantas daninhas com suspeita de resistência ao glifosato coletadas em pomares de citros de diferentes regiões do estado de São Paulo, Brasil.	28
FIGURA 6. Acúmulo de ácido chiquímico em plantas daninhas coletadas em pomares de citros de diferentes regiões do estado de São Paulo, Brasil.	32
FIGURA 7. Curvas de dose-resposta de glifosato em relação a percentuais de redução de massa fresca e sobrevivência de plantas caruru-de-mancha (<i>Amaranthus viridis</i> L.) Suscetíveis e resistentes, coletadas em pomares de citros no estado de São Paulo, Brasil.	46
FIGURA 8. Acúmulo de ácido chiquímico em populações de caruru-de-mancha (<i>Amaranthus viridis</i> L.) suscetíveis e resistentes ao glifosato, coletadas em pomares de citros no estado de São Paulo, Brasil.....	48
FIGURA 9. Atividade da EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase) em populações de caruru-de-mancha (<i>Amaranthus viridis</i> L.) suscetíveis e resistentes ao glifosato, coletadas em pomares de citros no Estado de São Paulo, Brasil.	49
FIGURA 10. Gel de agarose 3% (m/v) mostrando a eficiência da pcr realizada para as amostras (R) S1 a S9 da espécie <i>S. americanum</i>	58

FIGURA 11. Gel de agarose 3% (m/v) mostrando a eficiência da PCR realizada para as amostras (R) AVR2 e AVR2-1 da espécie <i>A. viridis</i>	58
FIGURA 12. Alinhamento parcial de nucleotídeos e aminoácidos previstos dos genes EPSPS para a espécie <i>Solanum americanum</i>	59
FIGURA 13. Alinhamento parcial de nucleotídeos e aminoácidos previstos dos genes EPSPS para a espécie <i>Amaranthus viridis</i>	60
FIGURA 14. Gel de agarose 3% (m/v) comparando da PCR semiquantitativa realizada para as amostras (R) AVR2-3 e o ALS	61
FIGURA 15. Gel de agarose 3% (m/v) comparando da PCR semiquantitativa realizada para as amostras (R) AVR2 e o ALS.....	62
FIGURA 17. Absorção de ¹⁴ C-glifosato em populações resistentes (R) e susceptíveis (S) de <i>A. viridis</i> e <i>S. americanum</i> das 12 às 72 h após tratamento (HAT).	63
FIGURA 18. Conjunto de imagens digitais (com fundo cinza) e imagens autorradiográficas (com fundo branco) de ¹⁴ C-glifosato em plantas suscetíveis e resistentes de (A) <i>S. Americanum</i> e (B) <i>A. viridis</i>	65

RESUMO

MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS AO GLIFOSATO EM POMARES DE CITROS NO ESTADO DE SÃO PAULO. A produção de citros, principalmente concentrada no Sudeste do Brasil, especialmente em São Paulo, enfrenta perdas significativas devido à matocompetição. O manejo eficaz de plantas daninhas é crucial para manter a produtividade dos pomares. No entanto, o uso excessivo de glifosato, o principal herbicida utilizado devido à sua eficácia e custo acessível, tem levado ao aumento da resistência das plantas daninhas exacerbando o problema. O estudo teve como objetivo identificar e avaliar níveis de resistência em plantas daninhas presentes em pomares de citros em diferentes regiões de São Paulo. Foram coletadas sementes resistentes e susceptíveis de *Amaranthus deflexus* (caruru rasteiro), *A. hybridus* (caruru-roxo), *A. viridis* (caruru de mancha), *Bidens pilosa* (picão preto), *Chloris elata* (capim branco), *Conyza bonariensis* (buva), *Digitaria insularis* (capim amargoso), *Solanum americanum* (maria-pretinha), e *Tridax procumbens* (erva de touro) em diferentes pomares de citros, todas no Estado de São Paulo. Experimentos de curvas dose-resposta e acumulação de ácido chiquímico confirmaram que as populações com suspeita de resistência ao glifosato *A. deflexus*, *A. hybridus* e *T. procumbens* apresentaram níveis de suscetibilidade ao herbicida semelhante aos de suas respectivas referências suscetíveis. As populações de *B. pilosa* também foram suscetíveis, porém, há risco de evolução de resistência. A maioria das populações de *C. bonariensis*, *C. elata* e *D. insularis* avaliadas mostrou diversos níveis de resistência ao glifosato. Identificou-se a primeira ocorrência de resistência ao glifosato no país e no mundo de *A. viridis* e *S. americanum*. Experimentos de atividade enzimática da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) mostraram que as populações resistentes de *A. viridis*, *B. pilosa*, *C. elata*, e *S. americanum* apresentaram maior atividade basal em comparação com suas respectivas populações suscetíveis. Para *D. insularis* os valores de atividade basal foram semelhantes para as populações resistentes e suscetíveis. Contudo, todas os biotipos resistentes destas espécies demandaram por maiores concentrações de glifosato para inibir a EPSPS em 50%, exceto a população R1 de *B. pilosa*. A absorção de glifosato oscilou de 28% a 44% das 12 às 72 horas após o tratamento (HAT) em plantas de *A. viridis*. Apenas a população R2 apresentou um padrão de absorção diferente em comparação com a população suscetível: translocando a menor quantidade de herbicida da folha tratada ao resto da planta e raízes, portanto, a resistência nessa população é atribuída à menor absorção e

translocação de glifosato. As plantas de *S. americanum* absorveram entre 35 e 50% de herbicida até as 72 HAT. A partir das 24 HAT, a população R1 absorveu entre 10 e 15% que as populações S e R2. O sequenciamento da região conservada do gene da EPSPS que interage com o glifosato não evidenciou qualquer mutação nas populações resistentes de *A. viridis* contudo, foi verificado que nessa espécie há uma superexpressão gênica na EPSPS. Na espécie *S. americanum* foi identificada uma dupla mutação nas posições Arg-105-Glu e Pro-106-Ser. Em pomares de citros em São Paulo, identificaram-se múltiplas espécies resistentes, mostrando que a falta de controle sobre uma espécie pode afetar o controle de outras espécies vulneráveis. Foi identificada a resistência ao glifosato em *A. viridis* e *S. americanum*, sendo os primeiros casos relatados no mundo para estas espécies.

Palavras-chave: superexpressão gênica; atividade enzimática; *A. viridis*; *S. americanum*; resistência a herbicidas, mutação Pro-106, Glifosato.

ABSTRACT

WEED RESISTANCE MECHANISMS IN CITRUS ORCHARDS IN THE STATE OF SÃO PAULO. Citrus production, mainly concentrated in Southeast Brazil, especially in São Paulo, faces significant losses due to weed competition. Effective weed management is crucial to maintaining orchard productivity. However, the excessive use of glyphosate, the main herbicide used due to its effectiveness and affordability, has led to increased weed resistance, exacerbating the problem. The study aimed to identify and assess resistance levels in weeds present in citrus orchards in different regions of São Paulo. Resistant and susceptible seeds of *Amaranthus deflexus* (low amaranth), *A. hybridus* (purple amaranth), *A. viridis* (green amaranth), *Bidens pilosa* (blackjack), *Chloris elata* (feather fingergrass), *Conyza bonariensis* (fleabane), *Digitaria insularis* (sourgrass), *Solanum americanum* (American black nightshade), and *Tridax procumbens* (coat buttons) were collected from different citrus orchards, all in the state of São Paulo. Dose-response and shikimic acid accumulation experiments confirmed that the populations suspected of glyphosate resistance *A. deflexus*, *A. hybridus*, and *T. procumbens* exhibited herbicide susceptibility levels similar to their respective susceptible references. *B. pilosa* populations were also susceptible; however, there is a risk of resistance evolution. Most *C. bonariensis*, *C. elata*, and *D. insularis* populations evaluated showed varying levels of glyphosate resistance. The first occurrence of glyphosate resistance in the country and worldwide for *A. viridis* and *S. americanum* was identified. 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) enzymatic activity experiments showed that resistant populations of *A. viridis*, *B. pilosa*, *C. elata*, and *S. americanum* exhibited higher basal activity compared to their respective susceptible populations. For *D. insularis*, basal activity values were similar for resistant and susceptible populations. However, all resistant biotypes of these species required higher glyphosate concentrations to inhibit EPSPS by 50%, except for the R1 population of *B. pilosa*. Glyphosate absorption ranged from 28% to 44% between 12 to 72 hours after treatment (HAT) in *A. viridis* plants. Only the R2 population showed a different absorption pattern compared to the susceptible population, translocating a smaller amount of herbicide from the treated leaf to the rest of the plant and roots. Therefore, resistance in this population is attributed to lower glyphosate absorption and translocation. *S. americanum* plants absorbed between 35% and 50% of the herbicide up to 72 HAT. From 24 HAT, the R1 population absorbed between 10% and 15% more than the S and R2 populations. Sequencing of the conserved

region of the EPSPS gene that interacts with glyphosate did not show any mutations in resistant populations of *A. viridis*; however, it was found that this species exhibits gene overexpression in EPSPS. In *S. americanum*, a double mutation was identified at positions Arg-105-Glu and Pro-106-Ser. In citrus orchards in São Paulo, multiple resistant species were identified, showing that failure to control one species can affect the control of other vulnerable species. Glyphosate resistance was identified in *A. viridis* and *S. americanum*, marking the first reported cases worldwide for these species.

Key words: gene overexpression; enzymatic activity; *A. viridis*; *S. americanum*; herbicide resistance, Pro-106 mutation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	CITROS	3
2.2	MANEJO DE PLANTAS DANINHAS EM CITROS	7
2.3	EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA.....	8
2.4	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A HERBICIDAS	11
2.5	GLIFOSATO	12
2.5.1	Propriedades químicas	12
2.5.2	Modo de ação e comportamento nas plantas.....	14
3	OBJETIVOS.....	18
3.1	GERAL.....	18
3.2	ESPECÍFICOS	18
4	CAPÍTULO 1 – OCORRÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS RESISTENTES AO GLIFOSATO EM POMARES DE CITROS DO BRASIL 19	
4.1	INTRODUÇÃO.....	19
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.2.1	Material vegetal	22
4.2.2	Ensaio de Dose-resposta	24
4.2.3	Acúmulo de Ácido Chiquímico	25
4.2.4	Análises Estatísticas	26
4.3	RESULTADOS	27

4.3.1	Ensaio de Dose-resposta	27
4.3.2	Acumulação de Ácido Chiquímico	30
4.4	DISCUSSÃO	33
4.5	CONCLUSÕES	36
5	CAPÍTULO 2 – RESISTÊNCIA AO GLIFOSATO EM <i>Amaranthus viridis</i> EM POMARES DE CITROS BRASILEIRO	38
5.1	INTRODUÇÃO	38
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	40
5.2.1	Material Biológico e Propagação de Mudanças em Estufa	40
5.2.2	Ensaio de Dose e Resposta de Glifosato	41
5.2.3	Acumulação do Ácido Chiquímico	42
5.2.4	Ensaio de Atividade da Enzima EPSPS	43
5.2.5	Análise Estatística	44
5.3	RESULTADOS	45
5.3.1	Redução da massa fresca e sobrevivência da planta	45
5.3.2	Acúmulo de Ácido Chiquímico	47
5.3.3	Ensaio de Atividade da Enzima EPSPS	48
5.4	DISCUSSÃO	50
5.5	CONCLUSÕES	52
6	CAPÍTULO 3 – IDENTIFICAÇÃO E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE <i>Solanum americanum</i> e <i>Amaranthus viridis</i>	53
6.1	INTRODUÇÃO	53
6.2	MATERIAIS E MÉTODOS	54
6.2.1	Amplificação e Sequenciamento do Gene EPSPS	54
6.2.2	PCR semiquantitativa (PCR-SQ)	56

6.2.3	Absorção e translocação de glifosato	56
6.3	RESULTADOS	57
6.3.1	Amplificação e Sequenciamento do Gene EPSPS	57
6.3.2	PCR semiquantitativa (PCR-SQ)	60
6.3.3	Absorção e translocação de glifosato	63
6.4	DISCUSSÃO	65
6.5	CONCLUSÕES.....	67
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa o segundo lugar como maior produtor de citros no mundo, seguindo a China (FAO, 2021). As variedades predominantes cultivadas no país incluem laranjeiras, tangerineiras, limeiras ácidas e limões verdadeiros (LOPES et al., 2011). Em 2019, a produção nacional de citros atingiu 19,6 milhões de toneladas (FAO, 2021). Destaca-se especialmente a produção de laranja, classificada como a nona cultura mais significativa em termos de valor de produção. O Estado de São Paulo lidera como o maior produtor de laranja do Brasil, alcançando mais de 13 milhões de toneladas na safra de 2022 (IBGE, 2022).

A produtividade de citros sofre interferência devido à presença de plantas daninhas (FAO, 2009). Embora essas plantas não sejam o fator biótico que mais chame atenção por não causarem danos diretos às plantas, seus efeitos em alguns pomares de citros podem resultar em perdas de até 80%, já seja pela redução do rendimento ou redução da qualidade dos frutos (MARTINELLI et al., 2017; AZEVEDO et al., 2020). Em culturas perenes, como os citros, os citricultores brasileiros preferem o controle químico de plantas daninhas, principalmente utilizando o herbicida glifosato ((N-(fosfonometil)glicina)) (MARTINELLI et al., 2022).

O glifosato é uma escolha frequente devido ao seu amplo espectro de controle, ação não-seletiva e alta sistemicidade, especialmente diante da complexidade em manejar as plantas daninhas que crescem junto com as plantas cultivadas (CESCO et al., 2024). Sua principal característica é sua capacidade de ser translocado, principalmente para os sumidouros metabólicos e os meristemas de crescimento, mesmo que estejam distantes do ponto de aplicação. Com alta mobilidade no floema e uma ação gradual, o herbicida consegue se disseminar por toda a planta, alcançando os meristemas e mostrando-se eficaz no controle

de plantas daninhas perenes (DUKE, 2020). Lançado no mercado em 1974, o uso global do glifosato aumentou consideravelmente, superando em mais de 100 vezes o volume inicialmente aplicado. Esse aumento foi impulsionado principalmente pela perda da patente em 2000, devido ao custo relativamente baixo em comparação com outros herbicidas e ao aumento das doses utilizadas para enfrentar as ervas daninhas que desenvolveram resistência aos herbicidas (MYERS et al., 2016; MARTINELLI et al., 2022).

Considerando esse fato, a evolução de biótipos resistentes ao glifosato tem sido inevitável. Em todo o mundo, há registros de 364 plantas daninhas resistentes a esse herbicida, enquanto no Brasil existem 20 relatos confirmados. O primeiro caso foi reportado em 2003, e entre 2003 e 2013 foram documentados apenas 7 casos. No entanto, a partir de 2014, o número de relatos praticamente dobrou (HEAP, 2024).

O mecanismo de ação do glifosato é único, atuando na via do ácido chiquímico, inibindo a 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) ao ocupar o sítio de ligação do fosfoenolpiruvato (PEP) (AMRHEIN et al., 1980). Isso inibe a formação de corismato, que é um precursor do ácido salicílico (hormônio de defesa das plantas) e de três aminoácidos aromáticos (triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe)). O corismato serve como precursor de uma ampla variedade de compostos aromáticos que desempenham papéis cruciais no crescimento, desenvolvimento, reprodução e defesa das plantas (HASLAM, 1993; HERMANN, 1995).

Nesse contexto, é fundamental realizar estudos a fim de caracterizar os mecanismos de resistência, identificar estratégias eficazes de manejo de plantas daninhas e desenvolver alternativas sustentáveis para proteger a produção de citros e garantir a segurança alimentar e econômica do país.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CITROS

Os citros compreendem uma vasta gama de plantas do gênero *Citrus* (Linnaeus) e outros gêneros relacionados, como *Fortunella* e *Poncirus*, além de híbridos da família *Rutaceae*. Esse grupo é predominantemente representado por laranjas (*Citrus sinensis*), tangerinas (*Citrus reticulata* e *Citrus deliciosa*), limões (*Citrus limon*), limas ácidas como o Tahiti (*Citrus latifolia*) e o Galego (*Citrus aurantiifolia*), bem como por variedades doces, como a lima da Pérsia (*Citrus limettioides*), pomelo (*Citrus paradisi*), cidra (*Citrus medica*), laranja-azeda (*Citrus aurantium*) e toranjas (*Citrus grandis*) (LOPES et al., 2011).

As espécies de citros, que tiveram sua origem em regiões tropicais e subtropicais da Ásia e do arquipélago Malaio ou Insulíndia, antes de se dispersarem para outras partes do mundo, alcançando as Américas no final do século XV, adaptaram-se principalmente a regiões subtropicais, concentrando-se em latitudes superiores a 20° N e 20° S. Esta observação é confirmada pela situação no Brasil, onde mais de 80% da produção está localizada acima da latitude 20° Sul (EMBRAPA, 2013).

De modo geral, as plantas do gênero *Citrus* são árvores de porte médio, geralmente alcançando cerca de quatro metros de altura, com uma copa densa e formato arredondado. As folhas são persistentes, podendo ou não apresentar espinhos e são, geralmente simples e aromáticas. As flores são pequenas, brancas e atrativas para abelhas, sendo utilizadas na produção de água de flor de laranjeira. Os frutos são ricos em vitamina C, vitaminas do complexo B e pró vitamina A, além de conterem sais minerais como cálcio, potássio,

sódio, fósforo e ferro. As raízes têm baixa capacidade de absorção de nutrientes devido ao pequeno número de pêlos absorventes e alta necessidade de oxigênio. A distribuição e quantidade de raízes dependem do tipo de porta-enxerto, da copa, da idade da planta e das condições do solo (TALON et al., 2020).

A história da citricultura brasileira remonta aos primeiros anos após a descoberta do país, quando os portugueses introduziram, em 1930, as primeiras sementes de laranja doce na Bahia e em São Paulo. No entanto, apenas a partir de 1930 é que a citricultura começou a se desenvolver comercialmente nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia, expandindo-se posteriormente por todo o território nacional (EMBRAPA, 2019).

A citricultura no Brasil tem ênfase na produção de laranja, tanto em área cultivada quanto em volume de produção. Além disso, essa atividade também é concentrada geograficamente: São Paulo e Minas Gerais abrigam o maior polo citrícola do país, respondendo por cerca de 70% da área cultivada e 83% da produção nacional de laranja (VIDAL, 2022).

Dados divulgados pela FAO referentes a 2019 destacam o papel do Brasil como o segundo maior produtor global de citros, com ênfase na produção de laranja, tangerinas, limas e limões, totalizando 19,6 milhões de toneladas, ficando apenas atrás da China. Além disso, o país liderou a produção de laranja, alcançando 17,1 milhões de toneladas, superando China, Índia, Estados Unidos da América e México, respectivamente. No segmento de tangerinas, o Brasil ocupou a sétima posição no ranking mundial com 0,98 milhão de toneladas, sendo superado por China, Espanha e Turquia, os três principais produtores, respectivamente. No que diz respeito a limas e limões, o Brasil se posicionou como o quinto maior produtor global registrando 1,5 milhão de toneladas, ficando atrás de Índia, China, México e Argentina, respectivamente (FAO, 2021).

Na produção de laranjas, o Brasil ocupou a segunda posição em produtividade, com 28,9 t.ha⁻¹. No grupo das tangerinas e tangores, o Brasil

conquistou a quarta posição, com $18,7 \text{ t.ha}^{-1}$, enquanto no segmento de limas e limões, ficou em terceiro lugar, alcançando uma produtividade de $26,8 \text{ t.ha}^{-1}$ (FAO, 2021). Em 2022, a área de plantio de laranja no país ultrapassou 568 mil hectares, resultando em uma produção de quase 17 milhões de toneladas. O valor total da produção neste mesmo ano foi superior a 14 bilhões de reais. (FAO, 2021).

A produção de citros está concentrada, principalmente, na região Sudeste do Brasil, especialmente no Estado de São Paulo, responsável por mais de 75% da produção nacional em 366.446 hectares (60% da área de cultivo de citros) (INCAPER, 2024).

Em 2022, o Brasil reafirmou sua posição como um dos principais produtores de laranjas do mundo, com um valor de produção acima de 14 milhões de reais e uma produção total de 16,9 milhões de toneladas (IBGE, 2022). Para alcançar esses números impressionantes, uma área considerável de 568.132 hectares foi dedicada ao cultivo de laranjas, mostrando o compromisso e o esforço dos agricultores em todo o país. Com um rendimento médio de $29.799 \text{ kg.ha}^{-1}$, fica evidente a eficiência e a expertise dos produtores brasileiros na obtenção de altos índices de produtividade (IBGE, 2022).

Esses resultados são ainda mais notáveis quando se considera o grande número de estabelecimentos envolvidos na produção de laranjas no Brasil, totalizando 55.912 unidades em 2017 (IBGE, 2022). Com um total de 259,596 milhões de pés de laranja em todo o país no mesmo ano, fica claro o alcance e a amplitude da indústria citrícola brasileira (IBGE, 2022).

São Paulo, um dos Estados mais proeminentes do país, liderou como o maior produtor de laranjas em 2022, responsável por mais de 75% da produção nacional em 366.446 hectares (60% da área de cultivo de citros) (MARTINS et al., 2023). Isso contribui significativamente para os impressionantes números alcançados pelo Brasil neste setor. Esses dados não apenas ressaltam a relevância econômica dos citros para o país, mas também

evidenciam o papel crucial que o Brasil desempenha no cenário global da produção de laranjas.

Em continuidade a essa liderança, em 2022, a produção de laranjas no Brasil continuou robusta, demonstrando sua importância econômica (IBGE, 2022). Com um valor de produção de 10.723.088 milhões de reais e uma quantidade de 13.025.994 toneladas colhidas, o setor de citros reafirma sua relevância. Apesar da redução no número de estabelecimentos agrícolas dedicados à citricultura, a alta eficiência dos agricultores resultou em um rendimento médio de 36.443 kg.ha⁻¹. Com 177,248 milhões de pés de laranja, o país mostra sua vasta extensão e diversidade na produção citrícola, destacando a resiliência dos produtores diante dos desafios enfrentados (IBGE, 2022).

As exportações brasileiras de suco de laranja na safra 2022/23 alcançaram números impressionantes, segundo dados da Secretaria de Comércio Exterior (SECEX), compilados pela Associação Nacional dos Fabricantes de Sucos Cítricos (CITRUSBR, 2024). O volume total atingiu 1,029 milhão de toneladas, gerando uma receita de US\$ 2,038 bilhões. Essas exportações englobam tanto o suco concentrado e congelado quanto a versão pronta para consumo (CITRUSBR, 2024).

A laranja é considerada um alimento funcional devido às suas várias propriedades nutraceuticas. Essas propriedades têm o potencial de retardar o processo de envelhecimento e ajudar na prevenção de doenças crônicas, como as cardiovasculares e o câncer. A presença de vitamina C na polpa desempenha um papel fundamental nesse processo, pois ajuda a manter o sistema imunológico saudável, prevenindo infecções e neutralizando os radicais livres, que são prejudiciais às células, ao DNA e às proteínas. Além disso, a vitamina C beneficia a saúde dos ossos, das cartilagens, dos músculos e dos vasos sanguíneos (EMBRAPA, 2021).

É crucial ressaltar que o Brasil mantém sua posição de liderança nesse setor, sendo responsável por mais de 80% das exportações mundiais de

suco de laranja. Esse domínio é ainda mais evidente quando consideramos os desafios enfrentados pelos Estados Unidos durante o mesmo período. Esses dados destacam a força e a competitividade do mercado brasileiro de citros, contrastando com a relativa insignificância das exportações de frutas cítricas frescas do país em comparação com o volume massivo de suco de laranja enviado para o exterior (CITRUSB, 2024).

No entanto, apesar do sucesso na produção, os desafios persistem. A matocompetição pode causar perdas de até 80% na produção de citros, portanto, o manejo de plantas daninhas é essencial para manter pomares altamente produtivos (AZEVEDO et al. 2020).

2.2 MANEJO DE PLANTAS DANINHAS EM CITROS

As plantas daninhas, assim como pragas e doenças, acarretam perdas significativas na citricultura. Os efeitos das doenças e pragas são mais evidentes, portanto, os danos das plantas daninhas muitas vezes passam despercebidas pelos citricultores. No entanto, o manejo adequado delas é igualmente crucial para o sucesso da produção citrícola.

As plantas daninhas, como fator biótico, têm o potencial de interferir diretamente no crescimento e na produção das plantas de citros. Elas competem por recursos essenciais ao crescimento das plantas, além de liberarem substâncias alelopáticas (BLANCO; OLIVEIRA, 1978). Indiretamente, atuam como hospedeiras intermediárias de pragas e patógenos (CHIAVEGATO, 1986). Somente no Brasil, são conhecidas 47 espécies de plantas daninhas que hospedam o ácaro-da-leprose dos citros (*Brevipalpus phoenicis*) e sete espécies que hospedam o fungo causador da podridão-floral-dos-citros (*Colletothricum acutatum*), entre outras (NUNES 2007; FRARE 2011).

O controle químico de plantas daninhas é frequentemente preferido pelos citricultores brasileiros e a maioria usa apenas glifosato (N-(fosfonometil)glicina). Além disso, suas aplicações geralmente são direcionadas à linha de plantio, sob a copa das plantas, mas podem ser realizadas em toda a entrelinha do pomar. O glifosato é um herbicida não seletivo que é translocado principalmente para drenos metabólicos, que podem estar distantes do local de aplicação. Além disso, suas propriedades móveis no xilema e floema e ação lenta permitem que o herbicida se mova por toda a planta para matar todos os meristemas, tornando-o eficaz até mesmo no controle de plantas daninhas perenes (DUKE, 2020).

A capacidade de mobilidade no xilema e floema e ação gradual permitem que o glifosato se dissemine por toda a planta, atingindo e eliminando todos os meristemas, o que o torna eficaz mesmo no controle de plantas daninhas perenes. O amplo e repetido uso deste herbicida pela maioria dos citricultores, que chegam a realizar até 10 aplicações por ano agrícola, tem contribuído para a seleção de biotipos de plantas daninhas resistentes ao glifosato (MARTINELLI et al. 2022). A ocorrência dessa resistência é um desafio a mais com o qual os produtores têm que lidar para manter produtividades rentáveis no setor citrícola.

2.3 EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA

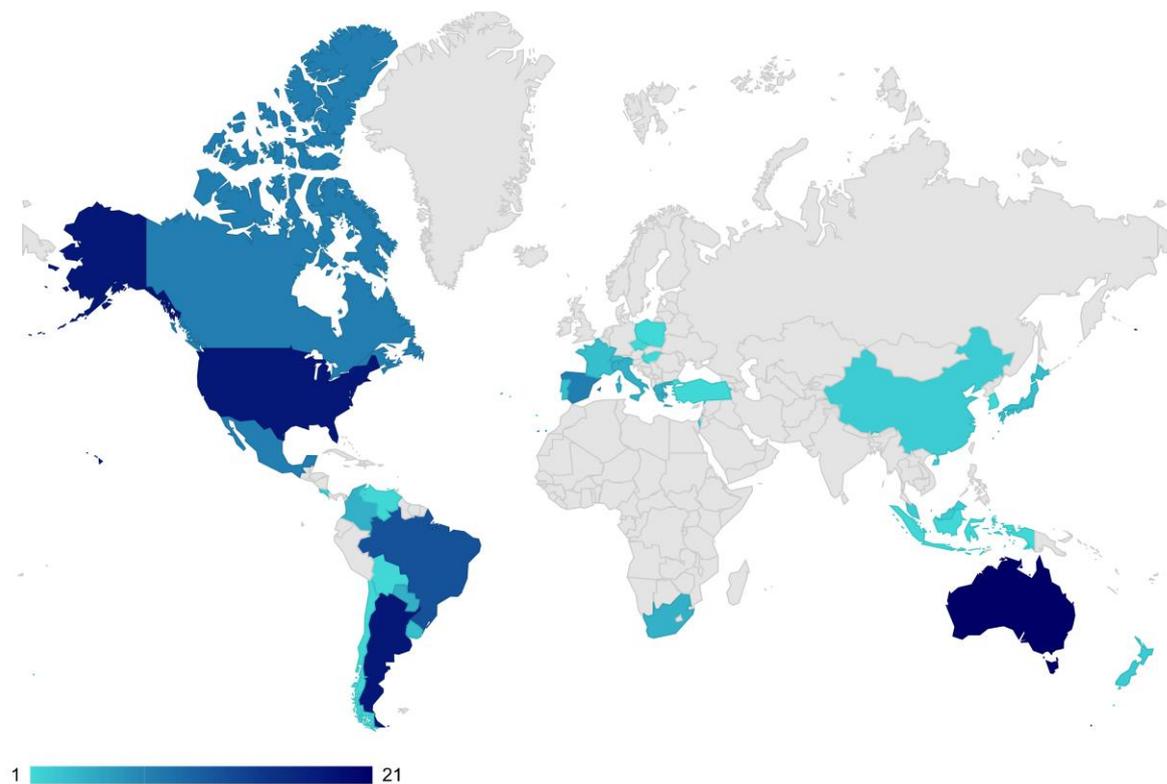
A definição de resistência a herbicidas pela *Weed Science Society of America* (WSSA) é “a capacidade hereditária de uma planta de sobreviver e reproduzir-se após a exposição a uma dose de herbicida normalmente letal para a variante selvagem. Numa planta, a resistência pode ocorrer naturalmente ou

ser induzida por técnicas tais como a engenharia genética ou a seleção de variantes produzidas por cultura de tecidos ou mutagênese”.

No ano de 1952, os primeiros casos registrados de resistência de plantas daninhas a herbicidas ocorreram, envolvendo um biótipo de *Commelina diffusa* nos Estados Unidos e um biótipo de *Daucus carota* no Canadá, ambos demonstrando resistência ao 2,4-D. No Brasil, o primeiro caso de resistência foi oficialmente confirmado em 1993, envolvendo a planta *Bidens pilosa* e sua resistência aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), identificado em uma plantação de soja no estado do Mato Grosso do Sul (ADEGAS et al., 2015).

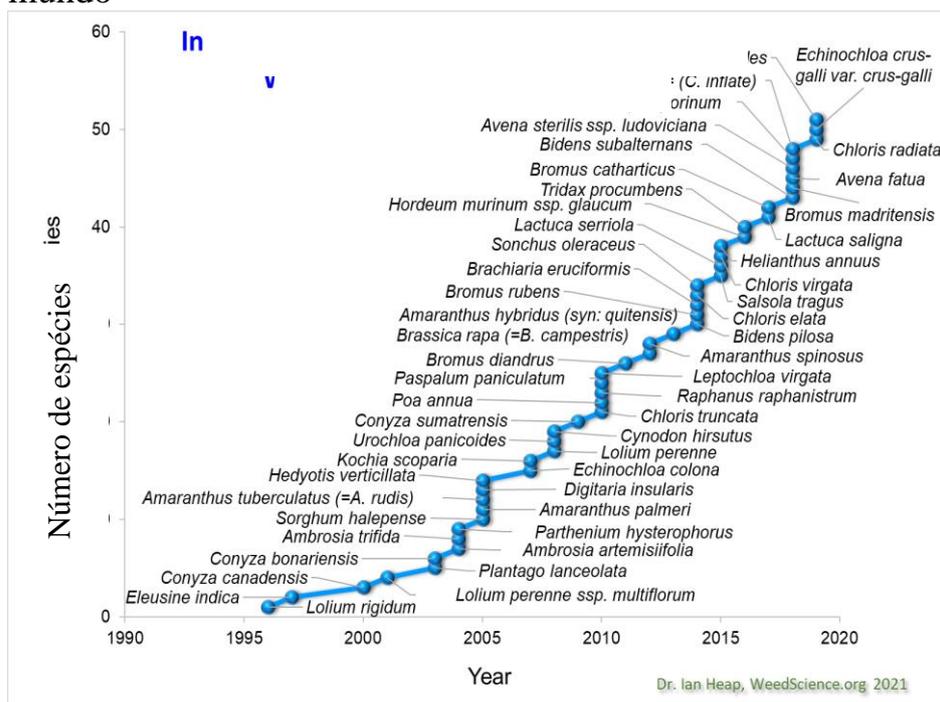
O primeiro relato de resistência de plantas daninhas ao glifosato no mundo foi registrado em 1996 e, no Brasil, o primeiro caso ocorreu em 2003 (SILVA et al., 2023). Desde então, essa tendência tem aumentado progressivamente, com o registro da presença de biótipos resistentes em diversas regiões do país. Atualmente, o mecanismo de ação do glifosato (inibição da EPSPS) ocupa o terceiro lugar em risco de seleção de resistência, com 59 casos, só atrás dos inibidores da acetolactato sintase (ALS) e do fotossistema II (PSII) (Heap, 2024). No Brasil, 12 espécies de plantas daninhas têm sido identificadas com biótipos resistentes ao glifosato (HEAP, 2024) (FIGURAS 1 e 2).

FIGURA 1. Mapa mundial dos casos de resistência ao glifosato



Fonte: Heap, 2024

FIGURA 2. Evolução dos casos de resistência ao glifosato por espécies no mundo



Fonte: Heap, 2024

No Brasil, a resistência de plantas daninhas a herbicidas é uma preocupação crescente na agricultura, com 59 espécies identificadas como resistentes. Dessas, 20 são resistentes ao glifosato (HEAP, 2024). A resistência das plantas daninhas a herbicidas no Brasil destaca a importância de abordagens de manejo diversificadas. Estratégias como rotação de culturas e uso criterioso de herbicidas são essenciais para controlar a resistência e promover a sustentabilidade na agricultura brasileira.

2.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A HERBICIDAS

A resistência a um herbicida surge da seleção de biótipos resistentes previamente existentes, os quais, devido à pressão de seleção resultante de aplicações repetidas do mesmo herbicida ou mecanismo de ação, encontram condições favoráveis para sua multiplicação (VENCILL et al., 2012).

Os mecanismos de resistência a herbicidas referem-se aos processos pelos quais as plantas daninhas desenvolvem a capacidade de sobreviver à exposição e aos efeitos dos herbicidas. Isso pode ocorrer de várias maneiras, sendo mecanismos dentro do sítio de ação (*target-site*) e fora do sítio de ação (*no target-site*).

Conforme apontado por Gains et al., (2020), a resistência aos herbicidas é atribuída a cinco mecanismos primários, sendo os mecanismos 1 a 3 no target site e os mecanismos 4 e 5 target site:

1. A diminuição da absorção e/ou translocação é a restrição do movimento de um herbicida em quantidade suficiente até o local de ação que permite à planta sobreviver.

2. O sequestro de um herbicida nas paredes celulares ou nos vacúolos reduz a concentração do herbicida que alcança o local de ação e pode resultar em resistência.
3. O metabolismo aprimorado é o aumento da capacidade de uma planta para metabolizar (degradar) substâncias não tóxicas de um herbicida antes que a mate.
4. A resistência no local alvo (frequentemente uma enzima) resulta da substituição de nucleotídeos na sequência de DNA da enzima alvo, causando mutações que alteram sua tradução em proteínas, mas sem perder sua função, limitando ou reduzindo a capacidade de um herbicida de se ligar ao local de ação.
5. A amplificação gênica/superexpressão aumenta a produção da enzima alvo, exigindo uma concentração mais alta do herbicida para inibir a enzima alvo e causar a morte.

Esses mecanismos podem resultar na ineficácia dos herbicidas para controlar as plantas daninhas, representando um desafio significativo para a gestão de plantas daninhas em agricultura e paisagismo (HEAP, 2014).

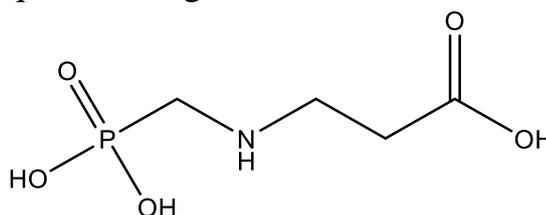
2.5 GLIFOSATO

2.5.1 Propriedades químicas

O glifosato, princípio ativo, foi inicialmente sintetizado por Henri Martin em 1950, na Cilag Company, localizada na Suíça. Posteriormente, em 1970, John Franz, da Monsanto Company nos Estados Unidos, identificou suas

propriedades herbicidas (PARROT et al., 1995). O glifosato, cujo nome químico é N-(fosfonometil)glicina de acordo com a nomenclatura da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), possui uma fórmula empírica de $C_4H_{10}NO_5P$ (FIGURA 3). Este composto é um ácido orgânico fraco, composto pela metade de glicina e metade de fosfonometil. Geralmente, é formulado como um sal do ácido desprotonado e um cátion. Sua pureza típica é superior a 90%. Fisicamente, o glifosato é um pó branco cristalino, inodoro, com densidade específica de 1,704 g/mL, baixa pressão de vapor e alta solubilidade em água. Ele é anfotérico, o que significa que pode reagir tanto como ácido quanto como base, e dependendo do pH pode existir como diferentes espécies iônicas. Essas propriedades físicas e químicas contribuem para sua eficácia como herbicida e sua ampla aplicabilidade em práticas agrícolas (MENSINK; JANSSEN, 1994).

FIGURA 3. Estrutura química do glifosato.



O glifosato é um herbicida de pós-emergência, pertencente à família química das glicinas substituídas. Ele é classificado como não-seletivo e de ação sistêmica. Sendo um herbicida total, possui um amplo espectro de ação, o que possibilita o controle de infestantes anuais ou perenes, tanto monocotiledôneas quanto dicotiledôneas, em áreas agrícolas, florestais e não cultivadas. Sua versatilidade permite seu uso em uma variedade de locais, incluindo sistemas de água, como irrigação e águas temporariamente drenadas, além de áreas urbanas, como parques, bermas de estradas e jardins (GALLI; MONTEZUMA, 2005; MENSINK; JANSSEN, 1994). No contexto nacional, o glifosato é o herbicida mais utilizado, o que o torna suscetível ao desenvolvimento de resistência por

parte das plantas daninhas. Por essa razão, é considerado um herbicida de elevado risco de resistência (MENDES et al., 2012).

2.5.2 Modo de ação e comportamento nas plantas

O glifosato é um herbicida sistêmico aplicado em pós-emergência, que é prontamente absorvido pelas folhas das plantas. A absorção ocorre nos órgãos que possuem clorofila, como folhas e tecidos verdes, enquanto sua translocação é facilitada pelo floema, movendo-se em direção aos tecidos meristemáticos (GALLI; MONTEZUMA, 2005). Sua eficácia depende de vários processos, incluindo a retenção da molécula na superfície foliar, sua penetração nas folhas, translocação na planta até o local de ação e a subsequente inibição da enzima-alvo, a EPSPS (KIRKWOOD; MCKAY, 1994; MONQUERO et al., 2004).

A absorção do glifosato é um processo bifásico, iniciando-se com uma rápida penetração inicial através da cutícula, seguida por uma absorção simplástica mais lenta. A duração desse processo é influenciada por diversos fatores, como a espécie e idade da planta, condições ambientais e concentração do herbicida na calda. Uma vez dentro da planta, ocorre a translocação simplástica pelos tecidos vasculares, movendo-se em direção aos sítios-alvo do herbicida (SATICHIVI et al., 2000).

O movimento do glifosato pelo floema segue a rota dos produtos da fotossíntese, direcionando-se das folhas fotossinteticamente ativas para as partes que utilizam esses açúcares, como raízes, tubérculos, rizomas, folhas jovens e zonas meristemáticas. A quantidade de açúcar translocada para cada parte varia durante o ciclo de vida da planta, influenciando o movimento do herbicida (DELLACIOPPA et al., 1986). Condições que favorecem a fotossíntese

auxiliam na translocação do glifosato. A translocação é um processo fundamental para a eficácia do herbicida (WANAMARTA; PENNER, 1989).

Além disso, a absorção e o metabolismo, assim como em outros estudos com o glifosato, podem afetar a suscetibilidade da planta ao herbicida. Ao nível celular, existem pelo menos dois mecanismos de absorção do glifosato: um sistema ativo, operando em baixas concentrações, e um sistema passivo de fluxo de massa, contribuindo para a compreensão do complexo processo de absorção e translocação do herbicida (SHANER, 2009).

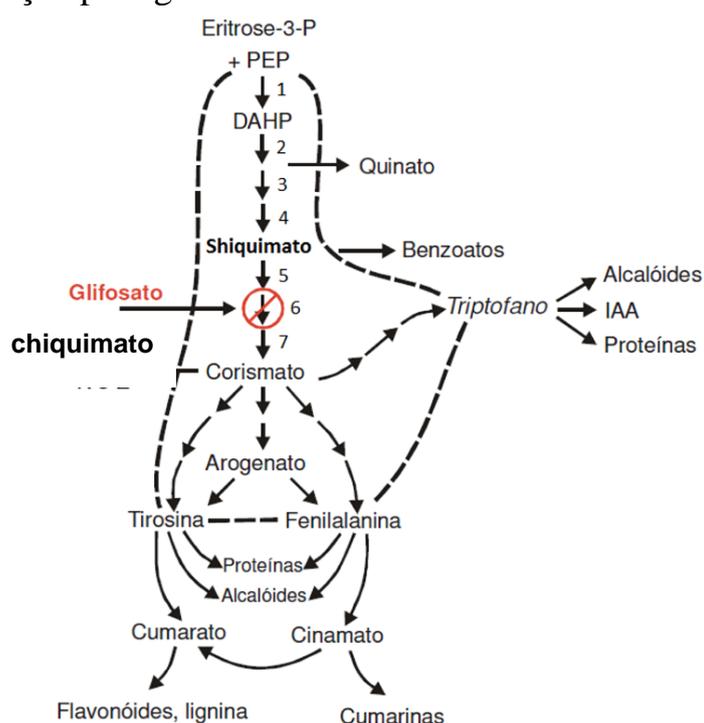
Nas plantas, a absorção e liberação de substâncias ocorrem de forma seletiva. Entretanto, devido ao fato de que o glifosato é derivado da glicina, um aminoácido essencial encontrado nas plantas, ele não é percebido como uma substância agressora e, conseqüentemente, é liberado em quantidades mínimas pelas raízes (COUPLAND; PEABODY, 1981).

O glifosato atua como um forte inibidor da atividade da enzima EPSPS. Esta enzima, sintetizada no núcleo e ativa no cloroplasto, possui um peptídeo de transporte que é liberado ao atingir o cloroplasto (SAMMONS E GAINES, 2014). A EPSPS catalisa uma etapa crucial na via do chiquimato, especificamente na formação da EPSPS e fosfato inorgânico a partir de fosfoenolpiruvato (PEP) e chiquimato-3-fosfato (S3P). Assim, o glifosato inibe a síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, essenciais para a biossíntese de proteínas (JABLONKAI, 2011). Além disso, interrompe a polimerização do monolignol, a síntese da lignina e outros metabólitos secundários responsáveis por desempenhar funções essenciais no desenvolvimento das plantas, tais como crescimento, reprodução e mecanismos de defesa (HASLAM, 1993; HERMANN, 1995). Esses compostos representam aproximadamente 30% do carbono fixado pela fotossíntese e aproximadamente 30% da massa seca da planta. Dessa forma, o glifosato também interfere no fluxo de carbono e no funcionamento de outras vias bioquímicas (MAEDA E DUDAREVA, 2012; ORCARAY et. al., 2012). Esse mecanismo de ação é

exclusivo entre todos os herbicidas conhecidos e é característico de plantas e microrganismos. Os animais não possuem a via metabólica dos aminoácidos aromáticos nem a enzima EPSPS, explicando assim a seletividade do glifosato para mamíferos e invertebrados. (SZÉKÁCS E DARVAS, 2012).

As sete reações enzimáticas da via do chiquimato estão associadas ao metabolismo central do carbono e à rede de aminoácidos, realizando a conversão do fosfoenolpiruvato (PEP) e do D-eritrose 4-fosfato (E4P) - intermediários nas vias da glicólise e do fosfato de pentose, respectivamente - em corismato. Este é o precursor universal para todos os aminoácidos e numerosos metabólitos derivados deles (DUKE; POWLES, 2008) (FIGURA 4).

FIGURA 4. A via do chiquimato, a sua relação com outras vias metabólicas e o sítio da sua inibição pelo glifosato.



Os números indicam as enzimas responsáveis por catalisar as reações na via do ácido chiquímico: (1) 3-desoxid-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintase; (2) 3-desidroquinato sintase; (3) desidroquinato desidratase; (4) chiquimato desidrogenase, (5) chiquimato quinase; (6) 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase, que é inibida pelo glifosato, e (7) corismato sintase.

Fonte: (Adaptado de Yamada e Castro, 2004)

Nesta via metabólica, uma molécula de D-eritrose 4-fosfato (E4P) e duas de fosfoenolpiruvato (PEP) são utilizadas na biossíntese do corismato. O triptofano é produzido a partir do corismato pela via do triptofano, enquanto a fenilalanina e a tirosina são sintetizados pelas vias do arogenato ou do fenilpiruvato/4-hidroxifenilpiruvato. Em plantas, as enzimas desidroquinato desidratase (DHD) e chiquimato desidrogenase (SDH) formam uma enzima bifuncional DHDS DH, enquanto as aminodesoxicorismato sintase α ($As\alpha$) e a aminodesoxicorismato sintase β ($As\beta$), assim como as subunidades α e β da triptofano sintase ($TS\alpha$ e $TS\beta$, respectivamente), formam complexos enzimáticos não covalentes AS e TS, respectivamente (MAEDA et al., 2012).

A enzima EPSPS catalisa o penúltimo passo da via do chiquimato, onde ocorre a formação do enolpiruvil-3-fosfato de chiquimato (EPSP), transferindo a porção enolpiruvil do PEP para a posição 5-hidroxila do chiquimato 3-fosfato. Essa unidade C3 enolpiruvil dá origem a cadeia lateral da fenilalanina e tirosina e é eliminada durante a biossíntese do triptofano. O glifosato age como inibidor competitivo da EPSPS, atuando no nível do segundo substrato, o PEP, ocupando o sítio de ligação do PEP ao complexo enzimático chiquimato 3-fosfato. As EPSPS de diferentes organismos são classificadas em duas categorias com base na sensibilidade ao glifosato: todas as plantas e a maioria das bactérias, incluindo a *Escherichia coli*, possuem enzimas EPSPS de classe I, altamente suscetíveis ao glifosato, algumas bactérias, como a estirpe CP4 de *Agrobacterium sp.*, possuem enzimas EPSPS de classe II, menos sensíveis ao glifosato. Desse modo, essas enzimas têm sido exploradas para a produção de culturas geneticamente modificadas tolerantes ao glifosato (MAEDA et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Identificar plantas daninhas (*Amaranthus deflexus*, *A. hybridus*, *A. viridis*, *Bidens pilosa*, *Chloris elata*, *Conyza bonariensis*, *Digitaria insularis*, *Solanum americanum* e *Tridax procumbens*) resistentes em pomares de citros de diferentes regiões de São Paulo e avaliar seu nível de resistência.

3.2 ESPECÍFICOS

- Confirmar a ocorrência de resistência ao glifosato nessas populações;
- Caracterizar o nível de resistência e os principais mecanismos *target site* (TSR) ou *no target site* (NTSR) envolvidos nos casos de resistência.

4 CAPÍTULO 1 – OCORRÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS RESISTENTES AO GLIFOSATO EM POMARES DE CITROS DO BRASIL

4.1 INTRODUÇÃO

Ao produzir 1,1 milhão de toneladas de suco de laranja, o Brasil irá produzir três quartos do suco de laranja do mundo na temporada 2022/2023 (USDA, 2024). A produção de citros está principalmente concentrada na região Sudeste do Brasil, especialmente no Estado de São Paulo, que é responsável por mais de 75% da produção nacional em 366.446 hectares (60% da área plantada com citros) (IBGE, 2019). Além de competir com as árvores cítricas, as plantas daninhas causam reduções de rendimento de até 80% podendo hospedar insetos vetores e patógenos e dificultar práticas culturais; assim, seu manejo é essencial para manter pomares saudáveis e altamente produtivos (FAO, 2021; MARTINELLI et al., 2023).

Embora algumas práticas não química de manejo de plantas daninhas estejam sendo adotadas em pequena escala por produtores de citros (SINGH; SHARMA, 2008), seu manejo em citros é principalmente baseado em herbicidas, direcionando aplicações nas áreas intra (sob a copa das árvores) e inter-ruas dos pomares (ALCÁNTARA-DE LA CRUZ et al., 2019). No entanto, devido ao fato de que, no Brasil, há poucos herbicidas autorizados (apenas 10 ingredientes ativos) para essa finalidade (BRACAMONTE et al., 2018), o herbicida mais utilizado é o glifosato, tanto pelo amplo espectro de plantas daninhas que é capaz de controlar quanto pelo seu baixo custo (ALCÁNTARA-DE LA CRUZ et al., 2019; CAETANO; CHRISTOFFOLETI; VICTORIA-FILHO, 2001; DUKE, 2018; SINGH; SHARMA, 2008).

O glifosato é um homólogo do fosfoenolpiruvato na via do ácido chiquímico, interrompendo a biossíntese do 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) ao inibir a atividade da EPSP sintase (VÁZQUEZ-GARCÍA et al., 2020). A interrupção dessa via metabólica causa o acúmulo de ácido chiquímico, afetando a síntese de três aminoácidos aromáticos essenciais: fenilalanina, tirosina e triptofano (VÁZQUEZ-GARCÍA et al., 2020). Portanto, é possível determinar a susceptibilidade/resistência ao glifosato através da concentração de ácido chiquímico presente nas plantas (HEAP, 2020). Este herbicida, além de ser barato e eficaz, possui outras propriedades interessantes, como baixa atividade residual no solo, baixa toxicidade para mamíferos, impacto ambiental mínimo, entre outros (CARVALHO et al., 2011; MOREIRA et al., 2007), tornando-o o pesticida químico agrícola mais utilizado no mundo (VÁZQUEZ-GARCÍA et al., 2020).

A baixa rotação de herbicidas e a ausência de estratégias economicamente viáveis de manejo integrado de plantas daninhas levaram a uma dependência extensiva e excessiva do glifosato. Como resultado, os relatos de baixa eficácia em relação ao glifosato na aplicação para controlar plantas daninhas aumentaram ano após ano. Além disso, a maioria dos produtores de citros comumente aumentam a concentração e a frequência de aplicação de glifosato em vez de usar herbicidas com outros mecanismos de ação (ALCÁNTARA-DE LA CRUZ et al., 2019; MARTINELLI et al., 2017). Levantamentos revelaram que 98% dos produtores de citros brasileiros utilizam glifosato, sendo que 73% aplicam doses entre 1.000 e 2.000 g de equivalente ácido (ea).ha⁻¹ e 11% doses > 2.000 g(ea).ha⁻¹. A frequência de aplicação varia e apenas 11% dos produtores aplicam glifosato uma vez ao ano; a maioria (78%) aplica glifosato duas a quatro vezes por ano, enquanto 11% aplicam mais de cinco vezes por ano (DUKE, 2018).

Em pomares de citros brasileiros, populações de *Conyza bonariensis*, *Conyza canadensis* e *Digitaria insularis* com resistência ao

glifosato foram relatadas desde antes de 2010 (ALCÁNTARA-DE LA CRUZ et al., 2020; SELLERS et al., 2003). As condições tropicais em que os citros são produzidos também favorecem o crescimento de plantas daninhas anuais e perenes (GARCÍA et al., 2019; THOMAS et al., 2006). Espécies dos gêneros *Amaranthus*, *Bidens*, *Chloris*, *Conyza*, *Eleusine*, *Lolium*, entre outros, são plantas daninhas que apresentam alto risco de evolução de resistência a herbicidas (RAIMONDI et al., 2015) e algumas delas já foram relatadas como resistentes a herbicidas em outras culturas no Brasil (FRANCISCHINI et al., 2014). Como as espécies desses gêneros ocorrem em altas densidades em pomares de citros (ALCÁNTARA-DE LA CRUZ et al., 2020), e também apresentam altas taxas de sobrevivência no campo após aplicações de herbicidas, é provável que novas espécies de plantas daninhas tenham desenvolvido resistência ao glifosato. Além disso, os produtores de citros exercem forte pressão de seleção sobre populações de plantas daninhas com glifosato (ALCÁNTARA-DE LA CRUZ et al., 2019; DUKE, 2018), então é provável que mais de uma espécie resistente ocorra no mesmo pomar. A ocorrência de várias espécies de plantas daninhas resistentes a herbicidas na mesma área aumenta consideravelmente os custos de manejo da resistência (KÜPPER et al., 2017).

Como o glifosato é o herbicida mais utilizado no Brasil, o objetivo deste capítulo foi identificar plantas daninhas resistentes ao glifosato em pomares de citros de diferentes regiões do Estado de São Paulo e verificar quantas espécies de plantas daninhas resistentes podem ser encontradas dentro do mesmo pomar. O nível de resistência foi determinado por ensaios de dose-resposta e acúmulo de ácido chiquímico.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal

Foram realizados levantamentos de campo em pomares de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e lima ácida Tahiti (*C. latifolia* Tan.) nos municípios de Araras, Cordeirópolis, Mogi-Mirim e Olímpia, estado de São Paulo. Nesses pomares, sementes de pelo menos 20 espécimes de cada espécie que sobreviveram à última aplicação de glifosato ($>720 \text{ g(ea).ha}^{-1}$) foram colhidas, e segundo os produtores, apresentaram sinais de resistência ao glifosato devido a grandes falhas de controle. As sementes foram identificadas e armazenadas em sacos de papel. Sementes susceptíveis da mesma espécie foram coletadas em um pomar de lima ácida Tahiti manejado ecologicamente (sem o uso de herbicidas) no município de Mogi-Mirim e no campus da Universidade Federal de São Carlos (campus São Carlos) em áreas não cultivadas. A lista de espécies de plantas daninhas coletadas em cada local está detalhada na Tabela 1.

TABELA 1. Identificação de populações de plantas daninhas com suspeita de resistência ao glifosato coletadas em diferentes pomares de citros do estado de São Paulo, Brasil.

População	Espécies	Característica botânica	Pomar	Município	Coordenadas	Ano(s)
S-Lim	<i>Bidens pilosa</i>	Dicotiledônea	Tahiti, lima ácida	Mogi-Mirim	22°25' S 47°10' O	2018 e 2019
	<i>Chloris elata</i>	Monocotiledônea				
	<i>Conyza bonariensis</i>	Dicotiledônea				
	<i>Digitaria insularis</i>	Monocotiledônea				
S-UFSCar	<i>Amaranthus deflexus</i>	Dicotiledônea	sem colheita	São Carlos	21°58' S 47°52' O	2019
	<i>Amaranthus hybridus</i>	Dicotiledônea				
	<i>Solanum americanum</i>	Dicotiledônea				
	<i>Tridax procumbens</i>	Dicotiledônea				

População	Espécies	Característica botânica	Pomar	Município	Coordenadas	Ano(s)
R-Ara	<i>Conyza bonariensis</i>	Dicotiledônea	Tahiti, lima ácida	Araras	22°18' S, 47°23' O	2019
	<i>Chloris elata</i>	Monocotiledônea				
	<i>Digitaria insularis</i>	Monocotiledônea				
	<i>Solanum americanum</i>	Dicotiledônea				
R-IAC	<i>Amaranthus deflexus</i>	Dicotiledônea	Pêra, laranja doce	Cordeirópolis	22°20' S 47°27' O	2018 e 2019
	<i>Amaranthus hybridus</i>	Dicotiledônea				
	<i>Bidens pilosa</i>	Dicotiledônea				
	<i>Conyza bonariensis</i>	Dicotiledônea				
	<i>Chloris elata</i>	Monocotiledônea				
	<i>Digitaria insularis</i>	Monocotiledônea				
	<i>Solanum americanum</i>	Dicotiledônea				
R1-lar	<i>Amaranthus deflexus</i>	Dicotiledônea	Pêra, laranja doce	Mogi-Mirim	22°25' S 47°09' O	2018 e 2019
	<i>Amaranthus hybridus</i>	Dicotiledônea				
	<i>Bidens pilosa</i>	Dicotiledônea				
	<i>Conyza bonariensis</i>	Dicotiledônea				
	<i>Chloris elata</i>	Monocotiledônea				
	<i>Digitaria insularis</i>	Monocotiledônea				
	<i>Solanum americanum</i>	Dicotiledônea				
R-NS	<i>Tridax procumbens</i>	Dicotiledônea	Laranja hamlin	Olímpia † — Nossa Senhora	20°51' S 48°58' W	2019
	<i>Bidens pilosa</i>	Dicotiledônea				
	<i>Chloris elata</i>	Monocotiledônea				
	<i>Tridax procumbens</i>	Dicotiledônea				
R-OdA	<i>Amaranthus hybridus</i>	Dicotiledônea	Pêra, laranja doce	Olímpia † — Olhos D'água	20° 46' S 49° 0' W	2019
	<i>Bidens pilosa</i>	Dicotiledônea				
	<i>Chloris elata</i>	Monocotiledônea				
	<i>Digitaria insularis</i>	Monocotiledônea				
R-PT	<i>Amaranthus hybridus</i>	Dicotiledônea	Pêra, laranja doce	Olímpia † — Passatempo	20° 43' S 49° 0' W	2019
	<i>Bidens Pilosa</i>	Dicotiledônea				
	<i>Conyza bonariensis</i>	Dicotiledônea				
	<i>Chloris elata</i>	Monocotiledônea				

† O segundo nome do município de Olímpia reflete os nomes das fazendas das quais as amostras de sementes foram coletadas.

As sementes de cada população foram germinadas em bandejas plásticas (31 × 15 × 10 cm) contendo uma mistura de substrato comercial

umedecido na capacidade do campo e areia (1:1 v/v) e cobertas com vermiculita expandida. As bandejas foram seladas e mantidas em casa de vegetação até a germinação (3-6 d). Mudas com 1–2 folhas verdadeiras foram transplantadas individualmente para vasos de 250 mL contendo substrato, areia e vermiculita (2:2:1 v/v/v) e adubadas com ~100 mg de 14-14-14 (Nitrogênio (N), Fósforo (P) e Potássio (K) (NPK)) (Forth Cote, Osmocote, Froth Jardim Ltda., Cerquillo, Brasil). As plantas foram mantidas em casa de vegetação até que fossem necessárias para uso nos experimentos.

4.2.2 Ensaios de Dose-resposta

Mudas de diferentes espécies com 3-4 folhas verdadeiras (roseta de 6-9 folhas no caso de *C. bonariensis*) foram tratadas com glifosato (Roundup® Original DI, 370 g ea L⁻¹, Monsanto, São Paulo, Brasil). As diferentes doses de glifosato testadas foram as seguintes: 0; 23,12; 46,25; 92,5; 185; 370; 740; 1.110; 1.480; 2.220 e 2.960 g(ea).ha⁻¹. As aplicações foram realizadas com um pulverizador costal pneumático equipado com um bico de leque plano (110,015, KGF Spray Nozzles, Vinhedo, Brasil) a 50 cm de altura do dossel. A pressão de aplicação foi de 30 psi, medida com um manômetro com glicerina (Modelo GCN, Cotergavi Instrumentos de Medição Ltda., São Paulo, Brasil) e adaptada à barra de aplicação para entregar 200 L.ha⁻¹. Conjuntos de 10 plantas de cada população de plantas daninhas foram tratados por dose de herbicida. Doses de 23,12 e 46,25 g.ha⁻¹ foram aplicadas apenas a plantas daninhas dicotiledôneas, e a dose mais alta (2.960 g.ha⁻¹) apenas em monocotiledôneas.

No 21 dias após o tratamento, foram registrados o peso fresco e a mortalidade das plantas, e os valores foram convertidos em porcentagens relativas ao controle não tratado para estimar o GR₅₀ (dose que reduz o massa

fresca em 50%) e/ou LD₅₀ (dose que mata 50% dos indivíduos em uma população) por meio de análise de regressão não linear, e calcular o fator de resistência (RF = R/S). Os experimentos foram repetidos para populações que apresentaram resistência ao glifosato.

4.2.3 Acúmulo de Ácido Chiquímico

Conjuntos de pelo menos 10 plantas de cada população de plantas daninhas foram tratadas com 370 e 740 g(ea).ha⁻¹ de glifosato. Um conjunto de plantas não tratadas de cada população foi reservado como grupo de controle para construir a curva de calibração com concentrações conhecidas de ácido chiquímico (0; 0,01; 0,05; 0,1 e 0,2 µg). Após 96 horas do tratamento, foram coletadas amostras de 50 mg de tecido fresco (das segundas e terceiras folhas) das plantas tratadas e não tratadas, as quais foram colocadas em tubos de 1,5 mL contendo 1 mL de HCl 0,25 N, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até o momento de uso. O acúmulo de ácido chiquímico foi determinado seguindo a metodologia de Cromartie e Polge (2002). As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e posteriormente incubadas por 45 minutos a 37 °C. Alíquotas de 50 µL foram transferidas para novos tubos contendo 200 µL de ácido periódico a 0,25% (p/v) e metaperiodato de sódio a 0,25% (p/v). Após nova incubação a 37 °C por 30 minutos, foram adicionados 200 µL de hidróxido de sódio a 0,6 N e sulfito de sódio a 0,22 N, seguido de homogeneização. Volumes de 300 µL foram transferidos para cubetas espectrofotométricas e então complementados com 600 µL de água destilada.

A absorvância das amostras foi medida em um comprimento de onda de 380 nm em um espectrofotômetro de matriz de diodos (HP 8425A, Palo Alto, CA, EUA). O acúmulo de ácido chiquímico foi determinado a partir da

diferença entre as plantas tratadas e não tratadas, e os resultados foram expressos em μg de ácido chiquímico por grama de tecido fresco. Cinco amostras com três réplicas técnicas foram analisadas por população em um delineamento completamente aleatório.

4.2.4 Análises Estatísticas

Os valores de GR_{50} e LD_{50} foram calculados usando a seguinte equação: parâmetros $Y = c + \{(d - c)/[1 + (x/g)^b]\}$ (RITZ et al., 2015). Nesta equação, y é a resposta a 50% do parâmetro de interesse, d é o limite superior da curva, c é o limite inferior da curva, b é a inclinação da curva, x é a(s) dose(s) do herbicida, e g é o ponto de inflexão da curva (GR_{50} ou LD_{50}). As análises de regressão foram realizadas usando o SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA).

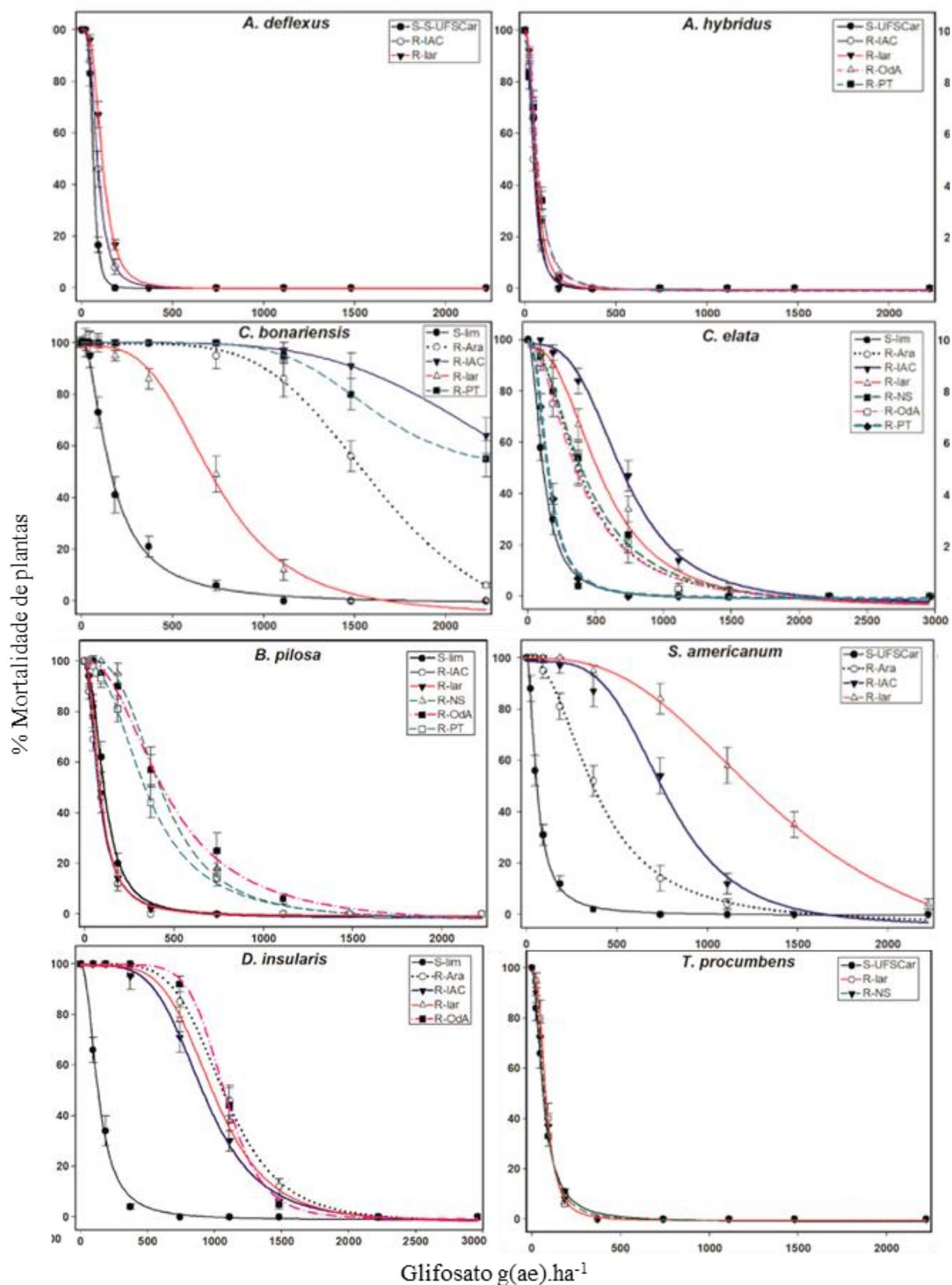
Após verificar a normalidade dos dados de acúmulo de ácido chiquímico usando o teste de Shapiro-Wilk, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando necessário, o teste de Tukey com probabilidade $\alpha = 0,05$ foi realizado para comparar médias. As análises estatísticas foram realizadas usando o software Statistics 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, EUA).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Ensaio de Dose-resposta

Os biótipos com suspeita de resistência (*A. deflexus*, *A. hybridus*, *B. Pilosa* e *T. procumbens*) mostraram-se sensíveis ao glifosato, apresentando valores de GR₅₀ e LD₅₀ similares aos determinados para suas contrapartes suscetíveis. Em todos os casos, esses valores ficaram próximos ou abaixo de 100 g(ea).ha⁻¹, exceto as populações de *B. pilosa* da região de Olimpia (R-NS, R-PT e R-OdA), que apresentaram valores de LD₅₀ que variaram de 355 a 460 g(ea).ha⁻¹. Todas as populações de *C. bonariensis*, *C. elata* e *D. insularis* foram resistentes ao glifosato. Para *C. elata* e *D. insularis*, os fatores de resistência (RF) variaram de 1,9 a 8,3 em relação às suas contrapartes suscetíveis. *Conyza bonariensis* foi a espécie mais resistente, com RF de até 27,6 e, em alguns casos, não foi possível determinar o LD₅₀, uma vez que 50% das plantas em uma população não morreram com a dose máxima avaliada para dicotiledôneas (2.220 g ea ha⁻¹). *Solanum americanum* apresentou RF variando de 4,3 a 32,5 para GR₅₀ e de 6,8 a 25,4 para LD₅₀ quando comparados com suas populações suscetíveis correspondentes (FIGURA 5, TABELA 2).

FIGURA 5. Curvas dose-resposta da porcentagem de mortalidade de plantas dentro de uma população de espécies de plantas daninhas com suspeita de resistência ao glifosato coletadas em pomares de citros de diferentes regiões do estado de São Paulo, Brasil.



Barras verticais \pm desvio padrão (n = 10).

TABELA 2. Doses médias eficazes de glifosato para reduzir a massa seca (GR₅₀) e/ou a sobrevivência das plantas (LD₅₀) em 50% nas plantas daninhas coletadas em pomares de citros do estado de São Paulo, Brasil.

Espécies	População	GR ₅₀ (IC95%)	RF	LD ₅₀ (IC95%)	RF
<i>A. deflexus</i>	S-UFSCar	21,2 (3,5)	-	64,9 (4,1)	-
	R-IAC	25,6 (2,8)	1,2	82,3 (6,7)	1,3
	R-Lar	26,7 (1,6)	1,3	113,1 (8,6)	1,7
<i>A. hybridus</i>	S-UFSCar	40,9 (5,6)	-	56,9 (0,9)	-
	R-IAC	39,6 (2,8)	1,0	46,7 (3,5)	0,8
	R-Lar	41,9 (6,0)	1,0	60,7 (2,1)	0,5
	R-OdA	45,6 (1,7)	1,1	72,6 (8,7)	1,3
	R-PT	47,2 (4,6)	1,2	68,2 (6,4)	1,5
<i>A. viridis*</i>	S-Lim	38,1 (3,8)	-	113,1 (8,1)	-
	R-IAC	259,5 (52,4)	6,8	726,7 (59,2)	6,4
	R1-Lar	301,8 (39,4)	7,9	706,3 (45,4)	6,2
	R2-Lar	205,5 (42,5)	5,4	639,7 (75,1)	5,7
<i>B. pilosa</i>	S-Lim	46,1 (3,7)	-	109,6 (12,6)	-
	R-IAC	22,1 (3,3)	0,5	79,3 (8,3)	0,7
	R-Lar	32,5 (1,8)	0,7	87,2 (6,7)	0,8
	R-NS	74,4 (6,7)	1,6	434,2 (32,1)	4,0
	R-OdA	102,5 (5,9)	2,2	459,4 (27,5)	4,2
	R-PT	56,3 (4,9)	1,2	355,8 (17,8)	3,2
<i>C. bonariensis</i>	S-Lim	39,4 (2,2)	-	157,6 (8,6)	-
	R-Ara	793,2 (63,6)	20,1	1643,1 (142,1)	10,4
	R-IAC	1085,9 (136,5)	27,6	-	<9,3
	R-Lar	201,8 (34,2)	5,1	732,5 (68,2)	4,6
	R-PT	912,5 (53,4)	23,2	-	<9,3
<i>C. elata</i>	S-Lim	67,2 (14,6)	-	105,0 (13,4)	-
	R-Ara	193,4 (14,3)	2,9	380,1 (24,3)	3,6
	R-IAC	174,9 (29,4)	2,6	703,7 (15,6)	6,7
	R-Lar	243,7 (39,4)	3,6	534,4 (55,3)	5,1
	R-NS	125,3 (16,5)	1,9	702,4 (53,8)	6,7
	R-OdA	157,2 (11,8)	2,3	429,4 (28,1)	4,1
	R-PT	148,6 (13,6)	2,2	370,7 (36,4)	3,5
<i>D. insularis</i>	S-Lim	114,9 (8,3)	-	130,7 (0,8)	-
	R-Ara	265,9 (13,7)	2,3	1052,3 (54,1)	8,1
	R-IAC	658,9 (65,4)	5,7	917,0 (35,6)	7,0
	R-Lar	406,3 (80,9)	3,5	995,6 (66,7)	7,6
	R-OdA	732,0 (62,4)	6,4	1081,3 (71,8)	8,3
<i>S. americanum</i>	S-UFSCar	22,4 (1,8)	-	56,2 (1,9)	-

Espécies	População	GR ₅₀ (IC95%)	RF	LD ₅₀ (IC95%)	RF
	R-Ara	97,4 (40,8)	4,3	387,3 (41,6)	6,8
	R-IAC	261,5 (25,4)	11,6	757,3 (56,5)	13,5
	R-Lar	728,2 (25,8)	32,5	1430,7 (135,8)	25,4
	S-UFSCar	25,2 (2,4)	-	64,9 (3,8)	-
<i>T. procumbens</i>	R-Lar	34,3 (2,3)	1,4	80,5 (6,7)	1,2
	R-NS	28,7 (3,4)	1,1	72,0 (4,6)	1,1

Limites de IC95% dos intervalos de confiança a 95% (n = 10). RF = Fatores de resistência são as razões R-para-S GR₅₀ ou LD₅₀

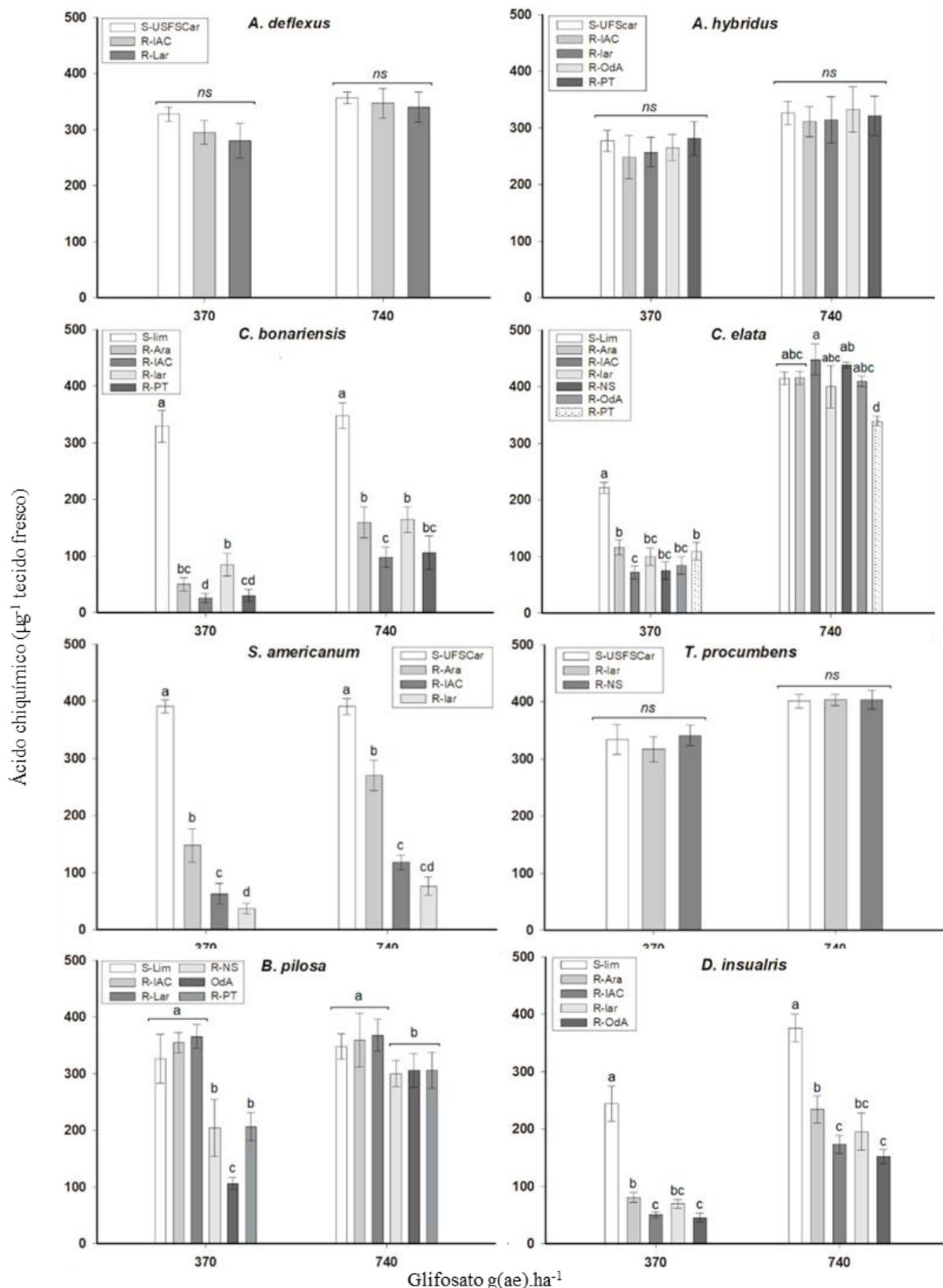
A maioria dos pomares de citros amostrados com problemas de manejo de plantas daninhas com glifosato apresentou a ocorrência de mais de uma espécie resistente a esse herbicida. Nos pomares de laranja da fazenda Nossa Senhora, a resistência foi identificada apenas para *C. elata*. Os pomares de citros das fazendas Olhos D'água (*C. elata* e *D. insularis*) e Passatempo (*C. bonariensis* e *C. elata*) apresentaram duas espécies resistentes ao glifosato. No entanto, todos os pomares da região de Olímpia mostraram sinais de resistência a *B. pilosa*. Quatro espécies (*C. bonariensis*, *C. elata*, *D. insularis* e *S. americanum*) com diferentes níveis de resistência ao glifosato foram identificadas no pomar de lima ácida (Tahiti) na região de Araras e, nos pomares de laranja doce (Pêra) dos municípios de Cordeirópolis e Mogi-Mirim, foram observadas quatro espécies resistentes (*C. bonariensis*, *C. elata*, *D. insularis* e *S. americanum*).

4.3.2 Acumulação de Ácido Chiquímico

O acúmulo de ácido chiquímico difere entre espécies e populações dentro das espécies. Similar aos resultados dos ensaios de dose-resposta, *A. deflexus*, *A. hybridus* e *T. procumbens* foram suscetíveis ao glifosato, uma vez

que acumularam grandes quantidades de ácido chiquímico tanto a 370 quanto a 740 g(ea).ha⁻¹. Plantas de *B. pilosa* de Olimpia e *C. elata* tratadas com 370 g(ea).ha⁻¹ acumularam entre 2 e 4 vezes menos ácido chiquímico do que suas contrapartes suscetíveis (S-Lim); no entanto, quando tratadas com uma dose de 740 g(ea).ha⁻¹, essas espécies acumularam quantidades de ácido chiquímico similares às populações S-Lim. Populações resistentes de *C. bonariensis*, *D. insularis* e *S. americanum* acumularam até 10 vezes menos ácido chiquímico do que suas contrapartes suscetíveis quando tratadas com 370 g(ea).ha⁻¹, e mesmo quando houve um aumento na dose de 740 g(ea).ha⁻¹, o acúmulo foi menor do que nas populações suscetíveis (FIGURA 6).

FIGURA 6. Acúmulo de ácido chiquímico em plantas daninhas coletadas em pomares de citros de diferentes regiões do estado de São Paulo, Brasil.



A mesma letra indica que não há diferenças entre os tratamentos, conforme determinado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Ns = não significativo. Barras verticais \pm desvio padrão ($n = 3$).

4.4 DISCUSSÃO

A dose recomendada de glifosato pelos fabricantes varia de 370 a 2.220 g(ea).ha⁻¹, dependendo da cultura e da espécie de planta daninha a ser controlada (BRADFORD, 1976). Devido à necessidade de múltiplas aplicações por ano agrícola, muitos produtores adotaram uma dose de 740 g(ea).ha⁻¹, que foi considerada a dose padrão em anos anteriores (CAETANO; CHRISTOFFOLETI; VICTORIA FILHO, 2001). No entanto, devido ao aumento das falhas no manejo de plantas daninhas, a maioria dos produtores aplica doses de pelo menos 1.080 a 1.110 g(ea).ha⁻¹ (MARTINELLI et al., 2022). Embora os produtores tenham relatado resistência ao glifosato em *A. deflexus*, *A. hybridus*, *B. Pilosa* e *T. procumbens*, as populações testadas dessas espécies foram suscetíveis tanto nos ensaios de resposta-dose quanto no acúmulo de ácido chiquímico. As falhas de controle observadas podem estar relacionadas à variabilidade envolvida no estágio fenológico das plantas daninhas. Embora os fabricantes recomendem a aplicação no estágio fenológico inicial de 4–6 folhas verdadeiras (BRADFORD, 1976) (como neste trabalho), o clima tropical do Brasil (RITZ et al., 2015) e a germinação escalonada das plantas daninhas (FERNANDEZ-ESCALADA et al., 2016) tornam impossível a aplicação de herbicidas em populações uniformes de plantas daninhas. O estágio fenológico influencia diretamente a eficácia dos herbicidas. Por exemplo, populações suscetíveis de *C. bonariensis* no estágio de roseta apresentaram um GR₅₀ de 15,7 g(ea).ha⁻¹; no entanto, nos estágios de crescimento e florescimento, os valores foram de 87 e 118 g(ea).ha⁻¹, respectivamente, ou seja, a suscetibilidade ao glifosato nesses estágios fenológicos foi 5,4 e 7,3 vezes menor do que no estágio de roseta (LORENTZ et al., 2014). O efeito de sombreamento imposto por plantas maiores sobre plantas menores também afeta a eficácia dos herbicidas (ADAPAR, 2024), e muitos produtores acabam

associando a resistência com as altas taxas de sobrevivência das plantas em seus pomares; no entanto, em muitos casos, as plantas podem não ter sido atingidas pelo herbicida ou foram atingidas por concentrações não letais.

As populações de *B. pilosa* observadas neste estudo, com base na redução significativa de peso com baixas doses de glifosato, podem ser classificadas como suscetíveis. Elas requerem atenção especial, pois as populações da região de Olímpia mostraram sinais de resistência ao glifosato, com valores de LD₅₀ variando entre 350 e 450 g(ea).ha⁻¹. *Bidens pilosa* é uma espécie que já foi relatada como altamente resistente ao glifosato, de acordo com estudos em pomares de citros no México (HEAP, 2005). Em um estudo paralelo deste grupo de pesquisa, foram identificadas populações resistentes dessa espécie com valores de LD₅₀ de até 880 g(ea).ha⁻¹ (DUKE, 2018). Isso sugere que já existem populações de *B. pilosa* com diferentes níveis de resistência em pomares de citros em São Paulo. Em contraste, todas as populações de *C. bonariensis*, *C. elata* e *D. insularis* testadas neste estudo foram consideradas resistentes ao glifosato. *Conyza bonariensis* e *D. insularis* já haviam sido identificadas como tendo resistência ao glifosato em pomares de citros brasileiros (ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, 2020; SELLERS et al., 2003), e *C. elata* em culturas de soja (TAKANO et al., 2017). Não há estudos que relatem a distribuição de resistência ao glifosato em espécies em pomares de citros no Brasil, ao contrário de outras culturas (ALCÁNTARA-DE LA CRUZ et al., 2016). No entanto, com base nestes resultados, pode-se concluir que populações resistentes dessas espécies estão amplamente distribuídas na região de produção de citros em São Paulo. Além da dispersão de sementes, a resistência pode ter sido produzida por eventos independentes (SALAS et al., 2015), uma vez que os níveis de resistência variaram entre as populações de cada espécie.

Solanum americanum é um caso inédito de resistência ao glifosato no Brasil e no mundo. Em 2020, *Amaranthus viridis* também foi relatada como resistente ao glifosato em alguns dos pomares de citros avaliados neste estudo

(R-Lar e R-IAC) (CAETANO et al., 2001), ou seja, essas duas novas espécies resistentes ao glifosato se juntam a espécies resistentes amplamente distribuídas, como *C. bonariensis*, *C. elata* e *D. insularis*, aumentando o desafio do manejo de plantas daninhas em pomares de citros no Brasil. A identificação de até cinco espécies resistentes reforça a situação complexa da resistência ao glifosato em alguns pomares de citros em São Paulo. Vários estudos já caracterizaram os mecanismos de resistência envolvidos em populações resistentes de *C. bonariensis*, *C. elata* e *D. insularis* no Brasil (ALCÁNTARA-DE LA CRUZ et al., 2020; SHANER et al., 2005; TAKANO et al., 2017), e embora seja possível que as populações deste estudo apresentem mecanismos diferentes dos relatados na literatura, os estudos futuros se concentrarão em caracterizar os mecanismos de resistência em *S. americanum*, assim como em *A. viridis*.

A ocorrência de múltiplas espécies resistentes ao glifosato no mesmo pomar de citros é preocupante, pois o manejo de plantas daninhas se torna mais difícil e dispendioso. O custo médio do manejo químico de plantas daninhas na soja em condições brasileiras foi estimado em R\$ 120,00 ha⁻¹.ano⁻¹ (KÜPPER et al., 2017). Esse custo aumenta com a presença de plantas daninhas resistentes a herbicidas. Quando ocorre apenas uma espécie resistente, o custo aumenta em R\$ 83,50 para espécies de *Conyza* sp., R\$ 98,00 para *Lolium* sp. e R\$ 227,00 para *D. insularis*; no entanto, quando várias espécies ocorrem (*Conyza* sp. + *D. insularis*), o aumento médio é de R\$ 312,00 (KÜPPER et al., 2017), ou seja, o custo do manejo de resistência quase quadruplica (R\$ 120,00 + R\$ 312,00 = R\$ 432,00), pois a aplicação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação é necessária.

Os produtores geralmente relutam em adotar estratégias integradas de manejo de plantas daninhas (GAINES et al., 2010), pois esses custos muitas vezes aumentam, e é compreensível que eles queiram reduzir os custos de produção. Além disso, na maioria das vezes, os produtores não têm uma projeção do aumento na produtividade e nas margens de lucro (NANDULA et

al., 2013). Pesquisas realizadas por este grupo de pesquisa mostram que, embora os custos crescentes do manejo de plantas daninhas em pomares de citros possam complicar suas estratégias de manejo, o potencial produtivo dos pomares e os retornos econômicos potenciais também aumentam (MARTINELLI et al., 2017). O controle mecânico de plantas daninhas é ineficiente e caro (R\$ 696,00 ha⁻¹), mas ao implementar a roçagem ecológica, os retornos econômicos podem dobrar em comparação com pomares não gerenciados (R\$ 7.212,00 vs. R\$ 3.344,00 ha⁻¹). O manejo de plantas daninhas com herbicidas pós-emergentes foi três vezes mais barato do que com herbicidas pré-emergentes (R\$ 435,00 vs. R\$ 148,00 ha⁻¹); no entanto, o retorno econômico foi semelhante, e a maioria dos agricultores adota esse método porque, além de ser barato, também é mais fácil de executar do ponto de vista prático. No entanto, a associação de herbicidas pré e pós-emergentes e roçagem ecológica (R\$ 500,00 ha⁻¹) aumentou o rendimento, melhorou a qualidade das frutas e triplicou os retornos econômicos (R\$ 11.124,00 ha⁻¹). Portanto, os pesquisadores têm a responsabilidade de produzir e transferir informações sobre estratégias de manejo de resistência a herbicidas que sejam logisticamente, tecnicamente e economicamente viáveis, uma vez que, na maioria das vezes, estudos que avaliam alternativas de manejo não avaliam os custos de cada estratégia, muito menos o potencial produtivo.

4.5 CONCLUSÕES

A ocorrência de múltiplas espécies de plantas daninhas resistentes ao glifosato foi identificada em pomares de citros de diferentes regiões de São Paulo, Brasil. O manejo incorreto de espécies amplamente distribuídas e resistentes ao glifosato, como *C. bonariensis* e *D. insularis*, dificulta o controle

de espécies suscetíveis, como observado com *A. deflexus*, *A. hybridus*, *B. pilosa* e *T. procumbens*. Além disso, este trabalho identificou a resistência ao glifosato em *S. americanum* pela primeira vez. Pesquisas futuras se concentrarão em caracterizar os mecanismos de resistência de populações resistentes, principalmente de *S. americanum*, com o objetivo de desenvolver estratégias de manejo de resistência que considerem o custo e o potencial produtivo dos pomares de citros.

Os resultados dessa pesquisa foram divulgados no artigo intitulado “Occurrence of Multiple Glyphosate-Resistant Weeds in Brazilian Citrus Orchards”, publicado na revista *AgriEngineering* em 2023.

5 CAPÍTULO 2 – RESISTÊNCIA AO GLIFOSATO EM *Amaranthus viridis* EM POMARES DE CITROS BRASILEIRO

5.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de citros (USDA, 2024). O estado de São Paulo (SP) responde por aproximadamente 77% da produção nacional de laranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), sendo o principal exportador de suco concentrado de laranja (IBGE, 2017). No entanto, o rendimento de frutas cítricas não é o melhor do mundo, principalmente devido ao manejo inadequado das plantações pelos agricultores (MARTINELLI et al., 2017). O rendimento médio de laranja é de 27,6 toneladas por hectare, ocupando a 13^a posição no ranking mundial (FAO, 2023). A presença de plantas daninhas pode ser diretamente ou indiretamente responsável por até 80% das perdas de rendimento em pomares de citros de árvores jovens e em crescimento (MARTINELLI et al., 2017; SINGH e SHARMA, 2008; AZEVEDO et al. 2020). Em pomares de citros maduros em plena produção, as plantas daninhas não têm um grande impacto no rendimento, mas podem dificultar as operações agrícolas (BRACAMONTE, 2018; ALCÁNTARA-DE LA CRUZ et al., 2019).

Práticas culturais e ecológicas em pequena escala, como o uso de coberturas mortas de resíduos de *Brachiaria*, são implementadas para o controle de plantas daninhas em citros brasileiros (MARTINELLI et al., 2017); no entanto, um método químico baseado no uso de herbicidas é o mais utilizado pelos agricultores (CAETANO; CHRISTOFFOLETI e VICTORIA FILHO, 2001). O glifosato é o herbicida mais utilizado e, em alguns casos, a única ferramenta de controle de plantas daninhas, que é aplicada até quatro vezes por

ano em altas doses (≥ 720 g(ea).ha⁻¹) (MARTINELLI et al., 2017). Em plantas suscetíveis, este herbicida inibe a atividade da EPSPS, causando o acúmulo de ácido chiquímico (DUKE, 2018; VÁZQUEZ-GARCÍA, 2020). O uso extensivo e excessivo de glifosato para controlar plantas daninhas levou à seleção de pelo menos 57 espécies com resistência a este herbicida no mundo (DUKE, 2018; HEAP, 2024). Especificamente, em pomares de citros brasileiros, *Conyza bonariensis*, *Conyza canadensis* e *Digitaria insularis* (DE CARVALHO, 2011; MOREIRA, 2007) foram relatados como resistentes ao glifosato. No entanto, espécies dos gêneros *Amaranthus*, *Bidens*, *Chloris*, *Conyza*, *Eleusine*, *Lolium*, entre outros, que apresentam altas taxas de ocorrência em pomares de citros (CAETANO; CHRISTOFFOLETI e VICTORIA FILHO, 2001), têm um grande risco de evolução de resistência não apenas ao glifosato, mas também a outros herbicidas (ALCÁNTARA-DE LA CRUZ et al., 2020).

A taxa de crescimento, capacidade reprodutiva, variabilidade genética e tolerância ao estresse são todas altas em espécies de *Amaranthus* (GARCÍA et al.; 2019; SELLERS, 2003). Essas características lhes conferem uma grande capacidade de evoluir resistência a herbicidas (SELLERS, 2003), o que torna difícil controlar essas espécies. A caruru-de-mancha (*Amaranthus viridis* L.) está amplamente disseminada em regiões tropicais e subtropicais em mais de 80 países (THOMAS et al., 2017). Essas espécies, assim como outras espécies de *Amaranthus*, são as plantas daninhas mais abundantes nas regiões sul e centro-oeste do Brasil (RAIMONDI et al., 2015). Em 2010, essa planta daninha foi relatada com resistência múltipla aos herbicidas inibidores da sintase acetolactato (ALS) e do fotossistema II em algodão nos estados da Bahia e Mato Grosso, Brasil (FRANCISCHINI et al., 2014) e, em 2015, *Amaranthus palmeri* foi encontrada com resistência ao glifosato e a herbicidas inibidores de ALS na soja no estado de Mato Grosso, Brasil (KÜPPER et al., 2017).

Este estudo partiu da hipótese de que o caruru-de-mancha pode ter desenvolvido resistência ao glifosato devido às altas taxas de sobrevivência

observadas no campo após aplicações do herbicida ao longo das últimas safras. Os objetivos foram avaliar a resistência ao glifosato, monitorar as taxas de acumulação de ácido chiquímico e verificar a atividade da EPSPS em três populações de caruru-de-mancha suspeitas de resistência.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Material Biológico e Propagação de Mudanças em Estufa

Sementes de três populações de *Amaranthus viridis* com suspeita de resistência ao glifosato foram coletadas de pelo menos 20 plantas que sobreviveram à última aplicação de glifosato ($\geq 720 \text{ g(ea).ha}^{-1}$) em dezembro de 2018. As populações R1 e R2 foram coletadas em pomares de laranja doce distantes 500 metros no município de Mogi-Mirim, SP, Brasil ($22^{\circ}25' \text{ S}$, $47^{\circ}09' \text{ W}$). A população R-IAC foi coletada no campo experimental de citros do Instituto Agrônomo (IAC) em Cordeirópolis, SP, Brasil ($22^{\circ}32' \text{ S}$, $47^{\circ}27' \text{ W}$). Sementes de uma população suscetível (S-Lim) usada como controle foram coletadas em um pomar orgânico (sem o uso de herbicidas) de lima ácida (Tahiti), também em Mogi Mirim (MARTINELLI et al., 2017).

Sementes de cada população foram germinadas em recipientes de plástico ($10 \times 20 \times 8 \text{ cm}$) contendo substrato (Insumax, Nova Europa, SP, Brasil) e areia (1:2, v/v), umedecidos até a capacidade de campo. Algumas dessas sementes foram semeadas e cobertas com vermiculita (2 mm), e os recipientes foram fechados.

As plântulas germinadas foram transplantadas de modo individual para vasos de 250 mL preenchidos com substrato, areia e vermiculita (2:2:1,

v/v/v). Dois dias após o transplante, as plântulas foram fertilizadas com cerca de 100 mg (5-6 grânulos) de 14-14-14 (Forth Cote, Osmocote, Froth Jardim Ltda., Cerquinho, SP, Brasil) e irrigadas conforme necessário até o uso. Plântulas com 3-5 folhas verdadeiras foram utilizadas em todos os experimentos, os quais foram mantidos sob condições de estufa (25-32°C, umidade relativa de 60 ± 10% e fotoperíodo de 16 horas) desde a germinação até as avaliações.

5.2.2 Ensaios de Dose e Resposta de Glifosato

As plantas das populações R e S foram tratadas com as seguintes doses de glifosato (Roundup Original DI, 370 g(ea).L⁻¹, Monsanto do Brasil Ltda.): 0; 45,25; 92,5; 185; 370; 740 (dose de campo de referência), 1.480 e 2.960 g(ea).ha⁻¹. O glifosato foi pulverizado utilizando um pulverizador costal pneumático equipado com um bico LBD-110015E (KGF Bicos para Pulverização, Vinhedo, SP), calibrado para aplicar 200 L.ha⁻¹ a 30 psi (pressão medida com um manômetro de glicerina - Modelo GCN, Cotergavi Instrumentos de Medição Ltda., São Paulo, Brasil - acoplado à barra de pulverização). O delineamento experimental (completamente aleatório) incluiu seis repetições por dose de glifosato. Quando os experimentos de resposta à dose foram repetidos, a dose de 2.960 g(ea).ha⁻¹ de glifosato foi excluída, mas uma dose de 22,63 g(ea).ha⁻¹ foi incluída. Em ambos os experimentos, o massa fresca foi determinado cortando as plantas ao nível do solo, e as taxas de mortalidade das plantas foram determinadas 21 dias após o tratamento. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao controle não tratado, e as doses médias eficazes que reduzem a massa fresca (GR₅₀) e causam a mortalidade das plantas (LD₅₀) em 50% foram determinadas por análise de regressão não linear.

5.2.3 Acumulação do Ácido Chiquímico

A acumulação do ácido chiquímico foi determinada por meio de duas abordagens. Na primeira delas, foi seguida a metodologia de Cromartie e Polge (2002). Um conjunto de plantas de cada população de *A. viridis* foi tratado com 370 g(ea).ha⁻¹ de glifosato, e outro conjunto de plantas não tratadas foi mantido como controle para construir a curva de calibração com concentrações conhecidas de ácido chiquímico (0; 0,01; 0,05; 0,1 e 0,2 µg). A primeira e a segunda folha das plantas tratadas e não tratadas foram cortadas em pequenos segmentos 96 horas após o tratamento (HAT). Amostras de 50 mg de tecido foliar fresco foram colocadas em tubos contendo 1 mL de HCl 0,25 N, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C para análises posteriores. As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e, em seguida, incubadas por 45 minutos a 37 °C. Alíquotas de 50 µL foram transferidas para novos tubos contendo 200 µL de ácido periódico 0,25% (p/v) + m-periodato de sódio 0,25% (p/v) (Solução 1). As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos, após o que, 200 µL de hidróxido de sódio 0,6 N + sulfito de sódio 0,22 N (Solução 2) foram adicionados e, finalmente, foram homogeneizadas. Volumes de 300 µL foram transferidos para cubetas espectrofotométricas contendo 600 µL de água destilada. A absorbância foi medida a 380 nm em um espectrofotômetro de arranjo de diodos (HP 8425A, Palo Alto, CA, EUA). A acumulação de ácido chiquímico foi determinada a partir da diferença entre plantas tratadas e não tratadas, e os resultados foram expressos em µg de ácido chiquímico por g de tecido fresco. Cinco amostras com três repetições foram analisadas por população em um delineamento completamente aleatório.

Na segunda abordagem, o ácido chiquímico foi quantificado *in vivo*, de acordo com Dayan et al. (2015), com modificações. Diferentes

concentrações de glifosato (0, 10, 50, 100, 200, 500 e 1.000 μM) foram preparadas em solução de fosfato monobásico de amônio 10 mM (pH ajustado para 4,4 com HCl 01 mol.L⁻¹). Amostras de segmentos de folha jovem de 50 mg (4 × 4 mm) foram colocadas em tubos contendo 1 mL da concentração correspondente de glifosato. Os tubos foram incubados por 24 horas em uma câmara de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) a 25 °C sob luz fluorescente (150 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Após a incubação, os tubos foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido, descongelados à temperatura ambiente e incubados a 60 °C por 30 minutos. As amostras receberam 250 μL de HCl 1,25 N e foram incubadas novamente a 60 °C por 15 minutos. Volumes de 75 μL das amostras foram transferidos para cubetas espectrofotométricas contendo 300 μL da solução 1 e incubados a 25 °C por 90 minutos em uma câmara de DBO. Finalmente, as amostras receberam 300 μL da solução 2, e a absorbância foi medida a 380 nm, como descrito anteriormente. O experimento foi conduzido com um delineamento completamente aleatório com três repetições (três replicatas cada uma) por concentração de glifosato. Os resultados foram expressos em μg de chiquimato por mL de solução de HCl ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).

5.2.4 Ensaios de Atividade da Enzima EPSPS

Cinco gramas de tecido foliar fresco de cada população de *A. viridis* foram colhidos, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C. A extração da enzima EPSPS foi realizada seguindo o protocolo descrito por Dayan et al. (2015). A proteína solúvel total (TPS) no extrato (atividade basal da EPSPS na ausência de glifosato) foi determinada pelo ensaio de Bradford (1976). A atividade específica da EPSPS foi avaliada na presença de glifosato (0, 1, 10, 100, 1.000 μM) usando o Kit de Ensaio de Fosfato

EnzChek (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para determinar a quantidade de fosfato inorgânico (μmol) liberado por μg^{-1} TSP min^{-1} em comparação com o controle (atividade basal). Três repetições por concentração de glifosato foram avaliadas. Os resultados foram expressos como a taxa de inibição da EPSPS em 50% (I_{50}).

5.2.5 Análise Estatística

Os valores de GR_{50} e LD_{50} foram calculados usando um modelo log-logístico de quatro parâmetros $Y = c + \{(d - c)/[1 + (x/g)^b]\}$ (RITZ et al., 2015) onde: Y = resposta em 50%; d e c são os limites superior e inferior da curva; b é a inclinação da linha; x é a dose do herbicida e g é a taxa de herbicida no ponto de inflexão da curva. O SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA) foi utilizado para obter esses parâmetros. Os fatores de resistência ($RF = R/S$) foram calculados como as razões de GR_{50} ou LD_{50} de R para S. Como os valores estimados de LD_{50} e GR_{50} para a população S diferiram entre as repetições dos experimentos de resposta à dose, os resultados foram apresentados separadamente para cada repetição.

Análise de variância unidirecional (ANOVA) foi realizada para a análise dos dados de acumulação de ácido chiquímico. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas, e o teste de Tukey com probabilidade $\alpha = 0,05$ foi conduzido para comparação das médias. As análises estatísticas foram realizadas usando o software Statistics 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, EUA).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Redução da massa fresca e sobrevivência da planta

A redução do massa fresca foi maior nos indivíduos da população de *amaranthus* S-Lim do que nas populações R. No primeiro experimento, a GR_{50} estimada para a população S foi de 22 g(ea).ha⁻¹ (TABELA 3). Assim, os FR das populações R variaram de 7,5, 8,7 e 11,3 para as populações R2, R-IAC e R1, respectivamente. Após repetição de experimentos dose-resposta, valor mais representativo de GR_{50} foi estimado para a população S-Lim (38 g(ea).ha⁻¹) devido à menor dose de glifosato incluída; enquanto os valores de GR_{50} das populações R foram semelhantes (de acordo com os intervalos confidenciais) aos estimados no primeiro experimento. Como o GR_{50} da população S-Lim foi maior no segundo experimento, a razão do nível de resistência ao glifosato em relação às populações R diminuiu e variou de 5,4 a 7,9 (FIGURA 7).

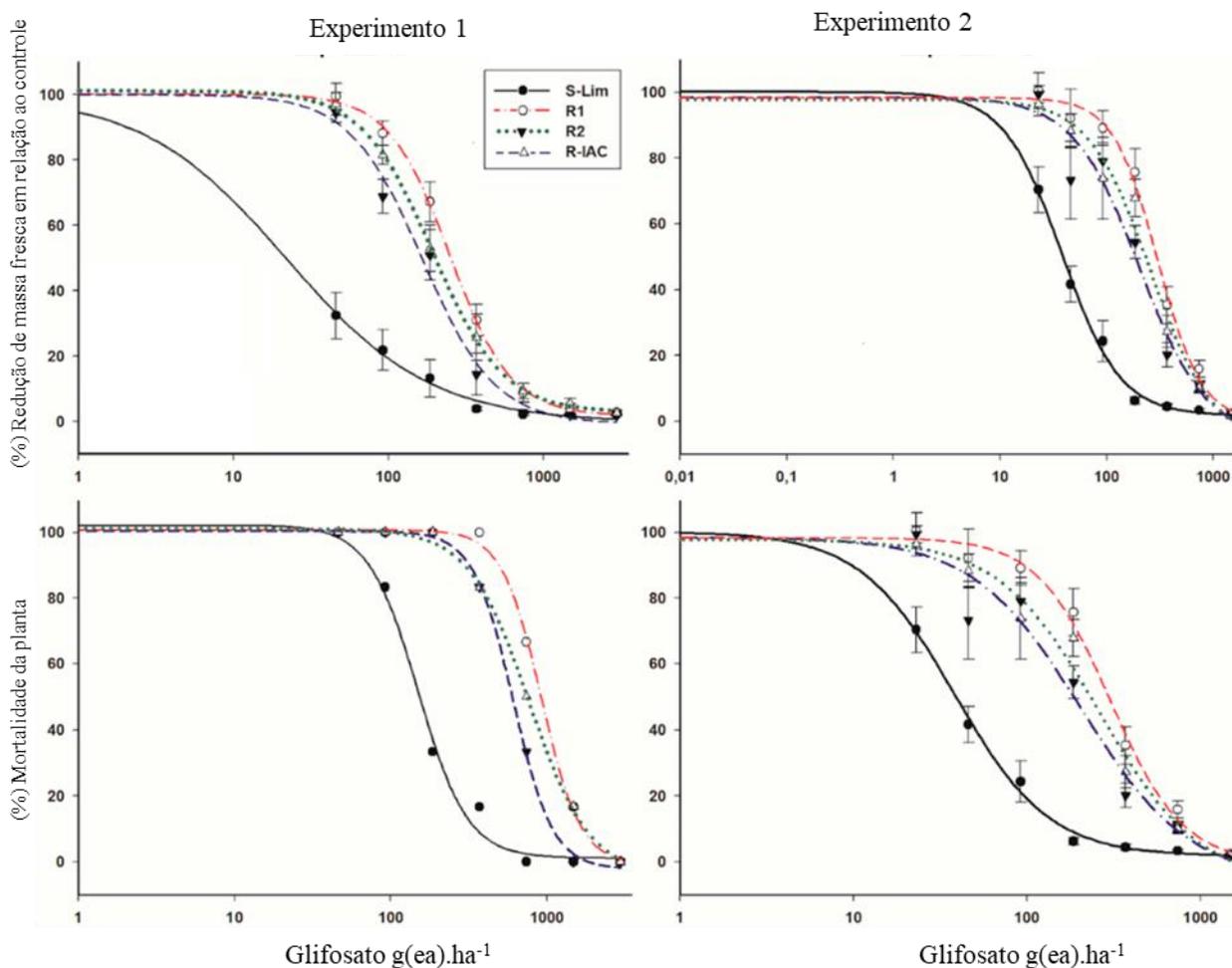
TABELA 3. Parâmetros das equações sigmoidais¹ utilizadas para estimar a dose média eficaz (g(ea).ha⁻¹) de glifosato necessária para reduzir o massa fresca em 50% (GR_{50}) e para causar mortalidade de plantas em 50% (LD_{50}) em populações resistentes (R1, R2 e R-IAC) e suscetível (S-Lim) de caruru-de-mancha (*Amaranthus viridis* L.), coletadas em pomares de citros no estado de São Paulo, Brasil.

Pop.	Redução do Massa fresca					Mortalidade das Plantas				
	c	d	b	$GR_{50} \pm CI$	RF ²	c	d	b	$LD_{50} \pm CI$	RF ²
Experimento I										
S-lim	0,3	99,9	0,9	22,0 ± 7,4	-	1,9	102,2	2,8	149,5 ± 11,8	-
R1	1,8	100,2	2,2	248,4 ± 17,7	11,3	1,1	100,7	3,4	918,9 ± 31,4	6,1
R2	0,6	100,1	1,9	165,9 ± 16,1	7,5	2,2	100,3	3,4	607,8 ± 15,1	4,1
R-IAC	2,9	101,3	1,9	192,2 ± 17,4	8,7	4,1	101,1	2,3	768,3 ± 32,6	5,1
Experimento II										
S-Lim	1,7	100,0	1,6	38,1 ± 3,8	-	0,4	101,4	3,4	113,1 ± 8,1	-
R1	0,4	98,4	2,1	301,8 ± 39,4	7,9	0	99,4	3,4	706,3 ± 45,4	6,2
R2	5,5	98,4	1,4	205,5 ± 42,5	5,4	4,6	96,7	3,6	639,7 ± 75,1	5,7
R-IAC	3,7	97,9	1,5	259,5 ± 52,4	6,8	4,9	97,0	2,7	726,7 ± 59,2	6,4

$^1Y = c + \{(d - c)/[1 + (x/g)^b]\}$, onde Y = redução de massa fresca ou mortalidade de plantas em 50% em relação ao controle, c = limite inferior, d = limite superior, b = inclinação da curva, g = dose de herbicida no ponto de inflexão (ou seja, GR₅₀ ou LD₅₀), e x = dose de herbicida. Os valores de IC são os limites de confiança de 95% (n = 6).

2 Os fatores de resistência são as razões de GR₅₀ ou LD₅₀ de R para S.

FIGURA 7. Curvas de dose-resposta de glifosato em relação a percentuais de redução de massa fresca e sobrevivência de plantas caruru-de-mancha (*Amaranthus viridis* L.) Suscetíveis e resistentes, coletadas em pomares de citros no estado de São Paulo, Brasil.



As barras verticais nos gráficos de redução de massa fresca representam o erro padrão da média (n = 6).

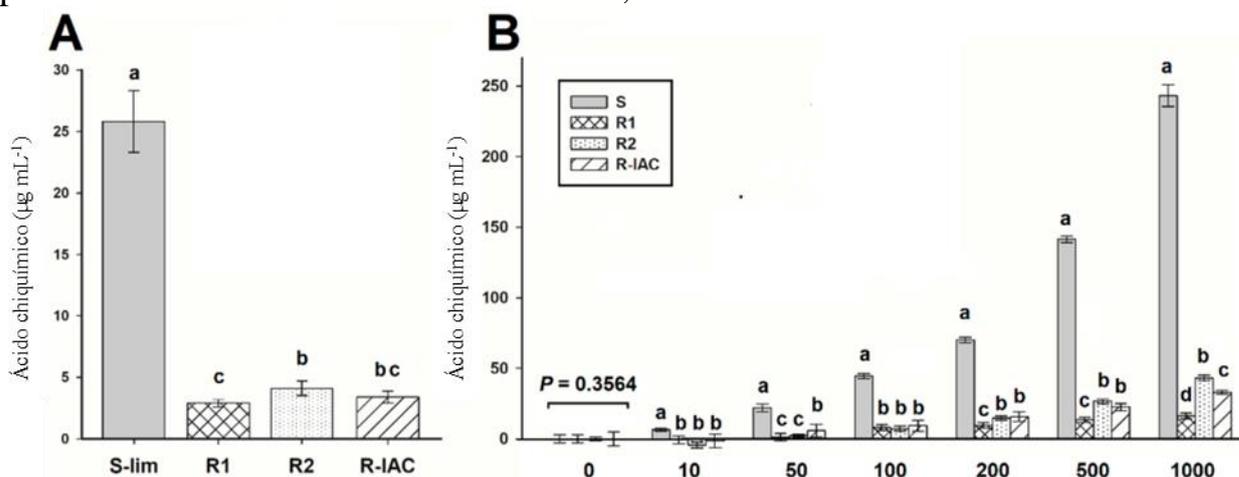
Com base na sobrevivência das plantas, a população S-Lim apresentou valores de LD₅₀ de 149 e 113 g(ea).ha⁻¹ nos experimentos I e II, respectivamente. No entanto, os indivíduos dessa população não sobreviveram a

doses de glifosato maiores que $370 \text{ g(ea).ha}^{-1}$. Nas populações resistentes, embora seus indivíduos tenham tido uma perda de peso significativa em relação aos respectivos controles não tratados, cerca de 50% de seus indivíduos sobreviveram à dose de campo de $720 \text{ g(ea).ha}^{-1}$. Além disso, as plantas das populações R1 e R-IAC sobreviveram a $1.480 \text{ g(ea).ha}^{-1}$. Assim, as populações R apresentaram entre 4,1 e 6,4 vezes mais resistência do que a população S-Lim. Em ambos os experimentos, a população R1 foi a mais resistente com base na menor redução de peso ou na maior taxa de sobrevivência de seus indivíduos (FIGURA 7, TABELA 3).

5.3.2 Acúmulo de Ácido Chiquímico

Ao monitorar o ácido chiquímico 96 horas após a aplicação (HAT), a população S-Lim acumulou cerca de $\sim 26 \mu\text{g.g}^{-1}$ de massa fresca. Essa quantidade de ácido chiquímico encontrada na população S foi entre 6 e 9 vezes maior do que a acumulada nas populações R, que acumularam menos de $4 \mu\text{g.g}^{-1}$ de massa fresca (FIGURA 8A). Nos ensaios *in vivo*, a maior quantidade de ácido chiquímico também foi encontrada na população S-Lim, que começou a acumulá-lo a partir da menor concentração de glifosato ($6.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em $10 \mu\text{M}$ de glifosato). O acúmulo aumentou à medida que as concentrações de glifosato aumentaram, atingindo cerca de $\sim 240 \mu\text{g}$ de ácido chiquímico por mL a $1.000 \mu\text{M}$ de glifosato. As populações R começaram a acumular ácido chiquímico somente a partir de $50 \mu\text{M}$ de glifosato; no entanto, tal acúmulo foi muito menor do que na população S-Lim. A $1.000 \mu\text{M}$ de glifosato, as populações R1, R2 e R-IAC acumularam 16, 43 e $33 \mu\text{g}$ de ácido chiquímico por mL, respectivamente (entre 5,6 e 15 vezes menos do que a população S-Lim) (FIGURA 8B).

FIGURA 8. Acúmulo de ácido chiquímico em populações de caruru-de-mancha (*Amaranthus viridis* L.) suscetíveis e resistentes ao glifosato, coletadas em pomares de citros no estado de São Paulo, Brasil.



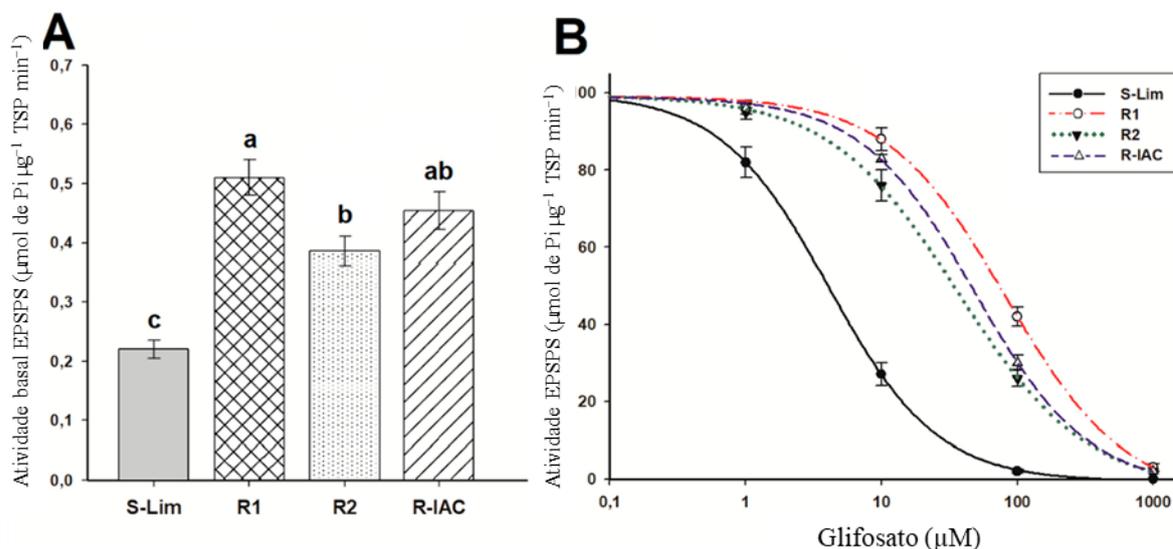
(A) acúmulo de ácido chiquímico em plantas pulverizadas com 360 g(ea).ha⁻¹ às 96 horas após o tratamento. (B) acúmulo *in vivo* de ácido chiquímico em diferentes concentrações de glifosato.

As barras verticais representam o erro padrão da média (n = 9).

5.3.3 Ensaio de Atividade da Enzima EPSPS

As populações de *A. viridis* resistentes apresentaram atividade basal mais elevada da enzima EPSPS em comparação com a população S (0,22 $\mu\text{mol de Pi } \mu\text{g}^{-1} \text{ TSP min}^{-1}$), mas houve diferenças entre elas (variando de 0,38 a 0,52 $\mu\text{mol de Pi } \mu\text{g}^{-1} \text{ TSP min}^{-1}$) (FIGURA 9A). Para inibir a atividade da EPSPS na população S-Lim, foram necessários apenas 4 μM de glifosato. A população R1 foi 20 vezes mais resistente do que a população S-Lim, e as populações R2 e R-IAC foram 9 e 12 vezes mais resistentes, respectivamente (FIGURA 9B, TABELA 4).

FIGURA 9. Atividade da EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase) em populações de caruru-de-mancha (*Amaranthus viridis* L.) suscetíveis e resistentes ao glifosato, coletadas em pomares de citros no Estado de São Paulo, Brasil.



(A) atividade basal da EPSPS (ausência de glifosato). Letras iguais acima das barras não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 95%. (B) curvas de dose-resposta da atividade da enzima EPSPS, expressa como porcentagem do controle não tratado, exposta a diferentes concentrações de glifosato (μM). Os histogramas representam as médias, e as barras verticais, o erro padrão ($n = 3$).

TABELA 4. Parâmetros das equações sigmoidais¹ utilizadas para estimar a concentração de glifosato (μM) necessária para inibir a EPSPS em 50% (I_{50}) em populações de caruru-de-mancha (*Amaranthus viridis* L.) resistentes e suscetíveis ao glifosato, coletadas em pomares de citros no estado de São Paulo, Brasil.

Pop.	c	d	b	$I_{50} \pm \text{CI}$	RF ²
S-Lim	0,5	99,9	1,1	4,0 \pm 0,3	-
R1	1,1	99,2	0,9	82,4 \pm 6,3	20,6
R2	2,6	99,4	0,9	36,4 \pm 3,6	9,1
R-IAC	2,1	98,9	1,0	48,4 \pm 4,4	12,1

¹ $Y = c + \{(d - c)/[1 + (x/g)b]\}$, onde Y = inibição da EPSPS em 50% em relação ao controle, c = limite inferior, d = limite superior, b = inclinação da curva, g = concentração do herbicida no ponto de inflexão (ou seja, I_{50}), e x = dose do herbicida. Os valores de IC representam os limites de confiança de 95% dos intervalos ($n = 3$).

²Fatores de resistência são as razões GR_{50} ou LD_{50} de R para S.

5.4 DISCUSSÃO

Os valores de GR_{50} encontrados para a população S-Lim de caruru-de-mancha foram inferiores a $100 \text{ g(ea).ha}^{-1}$ e mostraram a grande suscetibilidade desta espécie ao glifosato. Populações suscetíveis de *Amaranthus hybridus* (GARCÍA et al., 2019), *A. palmeri* (FERNANDEZ-ESCALADA et al., 2016) e *Amaranthus tuberculatus* (LORENTZ et al., 2014) também apresentaram valores de GR_{50} inferiores a $100 \text{ g(ea).ha}^{-1}$ (17, 89 e 61 g(ea).ha^{-1} , respectivamente). Em geral, as espécies de *Amaranthus* são muito sensíveis ao glifosato, de modo que as doses recomendadas pelos fabricantes variam de 370 (estágio inicial de crescimento) a 740 (estágio adulto) g(ea).ha^{-1} , enquanto para outras espécies de plantas daninhas, como *Panicum maximum*, *Richardia brasiliensis* e *Sida rhombifolia*, a dose mínima é de $1.850 \text{ g(ea).ha}^{-1}$ (ADAPAR, 2020). Considerando o estágio fenológico das plantas utilizadas nestes experimentos (3 a 5 folhas verdadeiras), a dose de referência deve ser de $370 \text{ g(ea).ha}^{-1}$. No entanto, uma dose de $740 \text{ g(ea).ha}^{-1}$ foi considerada como a dose de referência de campo, pois é a dose mínima de glifosato aplicada pelos produtores de citros brasileiros (MARTINELLI et al., 2017).

Um dos principais critérios para considerar uma planta daninha como um novo caso de resistência a herbicidas é que os indivíduos sobrevivam a uma dose normalmente letal para indivíduos de uma população selvagem (suscetível) da mesma espécie, e esses indivíduos sejam capazes de se reproduzir sexualmente, ou seja, a resistência deve ser herdável (HEAP, 2020; TAKANO et al. 2017). Os valores estimados de LD_{50} para as populações R de *A. viridis* foram próximos a $740 \text{ g(ea).ha}^{-1}$, com fatores de resistência variando de 4,1 a 6,4 em relação à população S-Lim ($LD_{50} \leq 150 \text{ g(ea).ha}^{-1}$). Esses resultados demonstraram que a dose de referência de campo não controlou satisfatoriamente cerca de 50% dos indivíduos das populações R. Embora não

seja arbitrário, a quantidade de herbicida suficiente para alcançar um nível de controle aceitável em uma população de plantas daninhas resistentes frequentemente requer pelo menos duas vezes sua LD₅₀ (ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, FERNÁNDEZ-MORENO e OZUNA, 2016). No entanto, aumentar a dose de herbicida não é recomendado, pois a pressão seletiva também aumenta, assim como o nível de resistência, dependendo do mecanismo de resistência envolvido (SALAS et al., 2015).

Em ambos os experimentos, as plantas R de *A. viridis* acumularam menos ácido chiquímico do que as plantas S-Lim, demonstrando a baixa sensibilidade das populações R a esse herbicida. O menor acúmulo de ácido chiquímico em plantas resistentes se deve ao fato de que o glifosato não atinge a EPSPS em quantidade suficiente para inibir essa enzima (SHANER et al., 2005). A população R1 apresentou um padrão de acúmulo de ácido chiquímico diferente daqueles observados nas populações R2 e R-IAC, sugerindo que os mecanismos que conferem resistência ao glifosato entre as populações R eram diferentes entre si.

Testes de atividade enzimática não revelaram diretamente o mecanismo envolvido na resistência, mas podem indicar se é um mecanismo de sítio-alvo ou não sítio-alvo. Nesse caso, as três populações R apresentaram níveis elevados de atividade basal da enzima em comparação com a população suscetível, o que poderia sugerir que uma superexpressão da EPSPS participou da resistência. Esse mecanismo tem sido o mais comum entre as espécies de *Amaranthus* resistentes ao glifosato, como *A. palmeri*, *A. tuberculatus* e *Amaranthus spinosus*, que apresentaram diferentes números de cópias do gene EPSPS, variando de 5 a mais de 160 (GAINES et al., 2010; GAINES et al., 2019; NANDULA et al., 2013; RIGGINS et al., 2010). Esse mecanismo pode conferir um nível imprevisível de resistência ao glifosato (GIACOMINI, WESTRA e WARD, 2019); no entanto, o I₅₀ mais elevado da população R1 sugere que outro mecanismo também esteja envolvido na resistência. Mutações

simples na posição 106 do gene EPSPS conferem níveis baixos de resistência ao glifosato (2 a 4 vezes a dose recomendada); redução da translocação do glifosato e sequestro no vacúolo conferem níveis moderados de resistência (4 a 8 vezes), e mutações duplas ou triplas nas posições 102, 103 e 106 conferem níveis altos de resistência (>10 vezes) (GARCÍA et al., 2019; GIACOMINI, WESTRA e WARD, 2019; YU et al., 2015). Estes resultados não nos permitiram confirmar o(s) mecanismo(s) que confere(m) resistência ao glifosato nas populações R de *A. viridis*; portanto, estudos bioquímicos e moleculares são necessários para desvendá-los.

5.5 CONCLUSÕES

Estes resultados confirmaram que o caruru-de-mancha (*A. viridis*) foi o primeiro caso relatado no mundo para esta espécie. Pelo menos um mecanismo do tipo sítio-alvo participou dessa resistência ao glifosato; no entanto, mais experimentos são necessários para elucidar os mecanismos de resistência envolvidos.

Os resultados dessa pesquisa foram divulgados no artigo intitulado “Glyphosate Resistance in *Amaranthus viridis* in Brazilian Citrus Orchards”, publicado na revista *Agriculture* em 2020.

6 CAPÍTULO 3 – IDENTIFICAÇÃO E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE *Solanum americanum* e *Amaranthus viridis*

6.1 INTRODUÇÃO

Os métodos de melhoramento de plantas possibilitaram o desenvolvimento de culturas resistentes a herbicidas, trazendo benefícios significativos para o controle de plantas daninhas. A introdução das culturas resistentes ao glifosato (GR) em 1996 revolucionou as práticas de manejo de plantas daninhas (DOMÍNGUEZ-MENDEZ et al., 2019). A adoção inadequada de culturas resistentes ao glifosato (GR), caracterizada pelo uso de doses elevadas e mais aplicações de glifosato do que as recomendadas pelo fabricante, resultou na seleção de uma variedade extensa de plantas daninhas resistente ao glifosato, reduzindo assim a sua eficácia (GARCÍA et al., 2019). *Lolium rigidum* foi a primeira erva daninha caracterizada como resistente ao glifosato, também em 1996, atualmente há 59 espécies identificadas como resistentes ao glifosato ao redor do mundo (HEAP, 2024).

Para as espécies do gênero *Solanum* já relatadas, existem apenas 22 casos registrados em todo o mundo, sem nenhum relato no Brasil. O primeiro caso foi documentado em 1978, com resistência a herbicidas inibidores da fotossíntese no fotossistema II, em uma lavoura de milho na Itália. Os inibidores que conferem resistência a espécies desse gênero até o momento são três tipos distintos. Em 1995, foi feito o primeiro relato da espécie *S. americanum* com resistência a herbicidas inibidores da fotossíntese no fotosistema I – desvio de elétrons, nos Estados Unidos (Flórida), em um pomar de tomates. Em 2009, foi reportado um novo caso dessa espécie com resistência ao mesmo herbicida pelo

mesmo inibidor, no entanto, esse relato ocorreu na Nova Zelândia, em um pomar de batata doce (HEAP, 2024).

Há 258 relatos de espécies de *Amaranthus* resistentes a pelo menos um mecanismo de ação. Dessas, 92 são resistentes ao glifosato, com apenas 3 casos reportados no Brasil. Destes, dois são para a espécie *Amaranthus palmeri* com resistência a herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) e EPSPS, e um para *Amaranthus hybridus* com resistência a herbicidas inibidores da EPSPS. Para a espécie *A. viridis*, há apenas um relato, também no Brasil, em uma lavoura de algodão, com resistência a herbicidas inibidores do fotossistema II e inibidores da enzima acetolactato sintase (HEAP, 2024).

O objetivo deste estudo foi identificar os mecanismos de resistência ao glifosato presentes em *S. americanum* e *A. viridis*, uma vez que não há relatos na literatura sobre essas espécies.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Amplificação e Sequenciamento do Gene EPSPS

Aproximadamente 100 mg de tecido foliar jovem de *Amaranthus viridis* e *Solanum americanum* foram coletadas de *Amaranthus viridis* e *Solanum americanum* das populações AVR2, AVR2-1 e AVR3 e de S1 a S9 respectivamente. As amostras foram moídas com nitrogênio líquido em almofariz e pistilo obtendo um pó fino. O DNA genômico foi extraído seguindo a metodologia descrita por Dellaporta (2009). A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose a 1% e quantificada por um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

A Tabela 5 lista as sequências dos *primers* utilizados para ambas as espécies. As amplificações de DNA foram realizadas em uma mistura de reação contendo 1 μL ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de DNA; 2,5 μL de tampão 10x (com 15 mM de MgCl_2); 1 μL (2,5 mM) da mistura de dNTP; 1 μL (1 μM) dos *primers Forward* (F) e *Reverse* (R) e 0,5 μL (5 U/ μL) de Taq DNA polimerase (BIOTOOLS) por 25 μL de mistura de reação. A PCR foi realizada em um termociclador Bio-Rad programado para 35 ciclos, como segue: 1 ciclo de 3 min a 95 °C; 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a (52 °C para as amostras de *S. americanum* e 54 °C para as amostras de *A. viridis*) e 1 min a 72 °C; e um ciclo final de extensão de 7 min a 72 °C. O produto amplificado foi visualizado em um gel de agarose a 3%, corado com gel red 10000x (Biotium) e fotografado sob luz UV (Chemidoc XRS+ Bio-Rad). O tamanho dos fragmentos foi estimado em relação a uma escada de DNA de 200 pares de bases (PB) (Fisher; faixa de 50 a 2.000). Pelo menos duas amplificações foram realizadas para cada amostra para garantir a consistência dos tamanhos dos fragmentos durante a eletroforese em gel.

TABELA 5. Conjunto de *primers* utilizados

Espécie	Primers	Sequência do Primers
<i>A. viridis</i>	F1-Am	5'-CACAACTGTGGTCGACAACTT-3'
	F2-Am	5'-TGGACGCTCTCAGAACTCTT-3'
	R1-Am	5'-CTTGAATTCCTCCAGCAACG-3'
<i>S. americanum</i>	F1-Sol	5'-GTCGGCAAGAAGTCTGAG-3'
	F2-Sol	5'-GGACTGTTGTTGACAATTTAC-3'
	F3-Sol	5'-CATTACATGCTTGGTGCATTG-3'
	R1-Sol	5'-AATGTCCACCAGCTRCAGT-3'
	R2-Sol	5'-CAGCTRCAGTAACTGCTGC-3'

6.2.2 PCR semiquantitativa (PCR-SQ)

Foi realizada uma PCR semiquantitativa para determinar a contagem de cópias de genes expressas pela planta, conferindo-lhe resistência por meio do mecanismo de superexpressão gênica.

A PCR foi realizada utilizando um termociclador Bio-Rad programado para 32 ciclos, com as seguintes etapas: 1 ciclo de 3 min a 95 °C; 32 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 54 °C para as amostras de *A. viridis* e 1 min a 72 °C. Após os ciclos 24, 28 e 32, foram retiradas alíquotas de 4 µL, as quais foram transferidas para novos microtubos de centrifugação contendo 1 µL do reagente de carregamento, e posteriormente transferidas para um gel de agarose a 3% para análise.

6.2.3 Absorção e translocação de glifosato

Diferenças na absorção e translocação de glifosato marcado com carbono 14 (¹⁴C-glifosato) foi avaliada em populações resistentes e susceptíveis de *A. viridis* e *S. americanum*. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba, SP, Brasil. Foram avaliadas duas populações resistentes e uma susceptível de cada população, as quais foram tratadas com solução comum de glifosato comercial + ¹⁴C-glifosato com uma atividade específica de 15 dpm's µL⁻¹. Cada planta foi tratada com cinco gotas de 1 µL⁻¹ (75,000 dpm.planta⁻¹) e as amostras (3 plantas de cada população em cada tempo de avaliação) foram coletadas as 12, 24, 48 e 72 horas após o tratamento seguindo a metodologia descrita detalhadamente no capítulo de livro publicado sobre o tema

(ALCÁNTARA-DE LA CRUZ et al. 2020). As porcentagens de absorção e translocação de ^{14}C -glifosato foram estimadas para cada população em relação ao total de herbicida aplicado e à porcentagem absorvida, respectivamente.

7.2.2. Análise Estatística

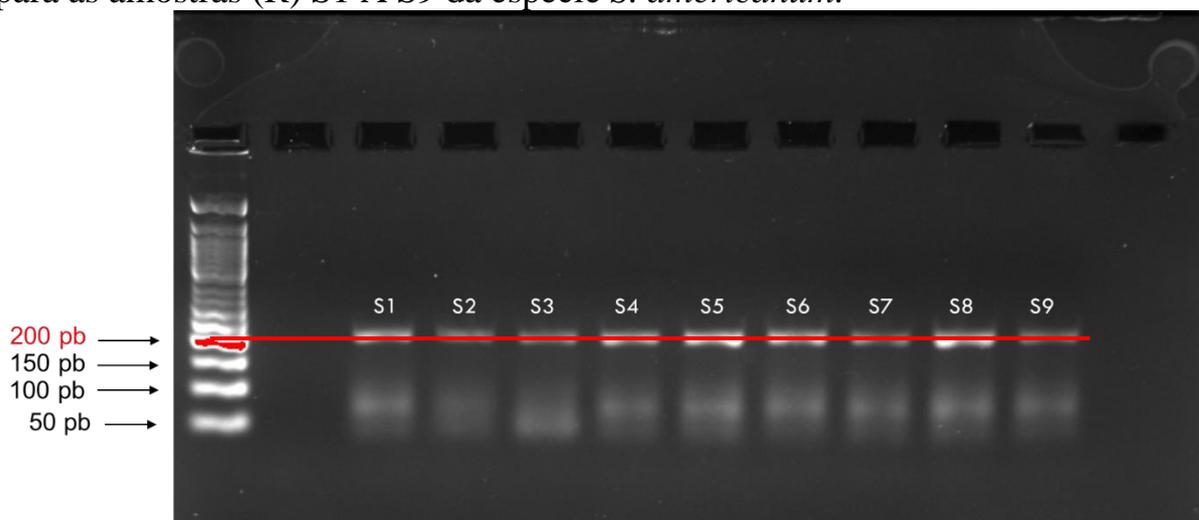
Os dados da atividade basal, absorção e translocação de ^{14}C -glifosato foram submetidos a análise de variância (ANOVA) no programa Statistix 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA). A distribuição normal dos erros e a homogeneidade das variâncias foram verificadas graficamente no mesmo programa. Diferenças de $p < 0.05$ foram consideradas significantes e as medias foram comparadas pelo teste de Tukey.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Amplificação e Sequenciamento do Gene EPSPS

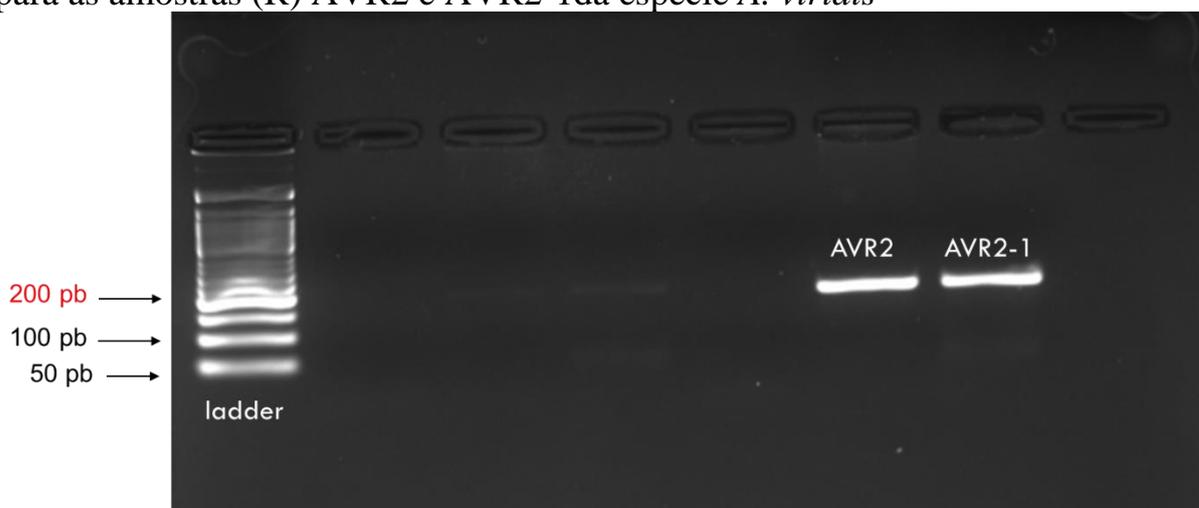
A melhor combinação de *primers* para a espécie *S. Americanum* foi F3Sol (5'-CATTACATGCTTGGTGCATTG-3') e R1Sol (5'-AATGTCCACCAGCTRCAGT-3'), para essa combinação era esperado fragmentos de 199 pb, na Figura 10 é possível observar a amplificação e ao tamanho do fragmento.

FIGURA 10. Gel de agarose 3% (m/v) mostrando a eficiência da pcr realizada para as amostras (R) S1 A S9 da espécie *S. americanum*.



Para a espécie *A. viridis* a melhor combinação de *primers* foi F2Am (5'-TGGACGCTCTCAGAACTCTT-3') e R1Am (5'-CTTGAATTTCCCTCCAGCAACG-3'), para essa combinação era esperado fragmentos de 199 pares de pb e o valor obtido foi próximo (FIGURA 11).

FIGURA 11. Gel de agarose 3% (m/v) mostrando a eficiência da PCR realizada para as amostras (R) AVR2 e AVR2-1 da espécie *A. viridis*



Tendo a confirmação da amplificação de ambas as espécies, o material genético foi encaminhado para o laboratório de Biologia Molecular da UNESP/Araraquara a fim de realizar o sequenciamento.

Na espécie *Solanum americanum*, identificou-se uma dupla mutação. Na posição 105, onde naturalmente ocorre a presença de uma arginina (R), observou-se a substituição por uma glutamina (Q). Além disso, na posição 106, identificou-se uma mutação da prolina (P) para alanina (A). Portanto, essa mutação caracteriza um caso inédito, como ilustrado na Figura 12.

FIGURA 12. Alinhamento parcial de nucleotídeos e aminoácidos previstos dos genes EPSPS para a espécie *Solanum americanum*.

Position	98			102			106			110			
<i>Capsicum annum</i> (JN160845)	gga	aat	gca	gga	act	gca	atg	cgg	cca	ttg	aca	gca	gca
	G	N	A	G	T	A	M	R	P	L	T	A	A
<i>S. americanum</i> S	gga	aat	gca	gga	aca	gca	atg	cgg	ccg	ttg	aca	gca	gca
	G	N	A	G	T	A	M	R	P	L	T	A	A
<i>S. americanum</i> R1	gga	aat	gca	gga	aca	gca	atg	cag	gcc	ttg	aca	gca	gca
	G	N	A	G	T	A	M	Q	A	L	T	A	A
<i>S. americanum</i> R2	gga	aat	gca	gga	aca	gca	atg	cgg	ccg	ttg	aca	gca	gca
	G	N	A	G	T	A	M	R	P	L	T	A	A

Os nucleotídeos destacados em azul não resultam em substituição de aminoácidos. Os nucleotídeos destacados em amarelo resultam na substituição de aminoácidos. As caixas laranja destacam uma substituição tripla de aminoácidos de RP (plantas suscetíveis ao glifosato ou tipo selvagem) para QA (plantas resistentes ao glifosato).

Nenhuma mutação foi identificada na espécie *A. viridis*; entretanto, os resultados globais sugerem que o mecanismo de resistência encontrado nessa espécie é, de fato, do tipo "target site", implicando uma causa genética na planta (FIGURA 13).

FIGURA 13. Alinhamento parcial de nucleotídeos e aminoácidos previstos dos genes EPSPS para a espécie *Amaranthus viridis*.

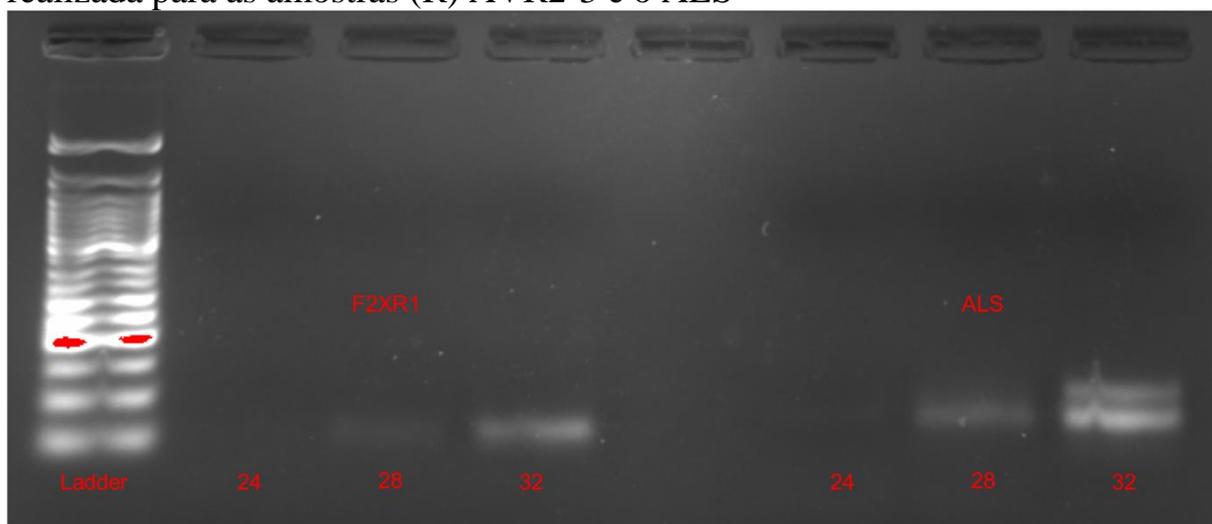
Position	98				102				106				110
<i>A. palmeri</i> S (MK069608)	ggt G	aat N	gca A	gga G	aca T	gcg A	atg M	cgc R	cca P	ttg L	aca T	gct A	gcg A
<i>A. palmeri</i> R (MK069609)	ggt G	aat N	gca A	gga G	aca T	gcg A	atg M	cgc R	tca S	ttg L	aca T	gct A	gcg A
<i>A. viridis</i> S	ggt G	aat N	gca A	gga G	aca T	gca A	atg M	cg R	cca P	ctt L	acc T	gct A	gcg A
<i>A. viridis</i> R1	ggt G	aat N	gca A	gga G	aca T	gca A	atg M	cg R	cca P	ctt L	acc T	gct A	gcg A
<i>A. viridis</i> R2	ggt G	aat N	gca A	gga G	aca T	gca A	atg M	cg R	cca P	ctt L	acc T	gct A	gcg A

Os nucleotídeos destacados em azul não resultam em substituição de aminoácidos.

6.3.2 PCR semiquantitativa (PCR-SQ)

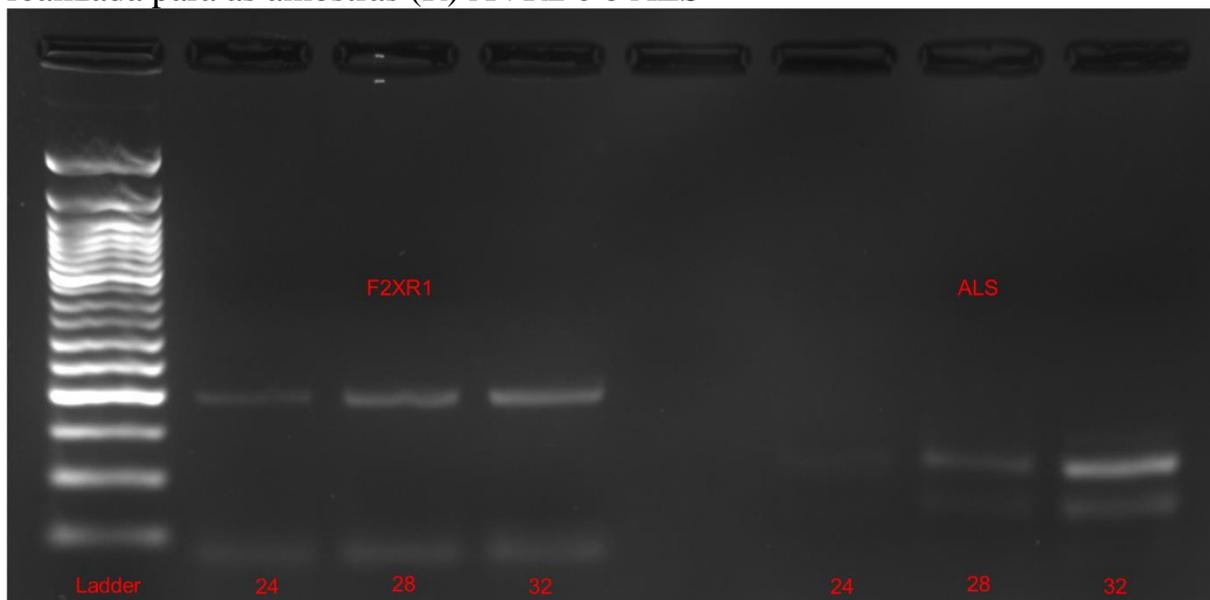
Esses experimentos foram realizados somente com a espécie *Amaranthus viridis*. Na análise da PCR semiquantitativa da amostra AVR2-3, evidenciou-se a ausência de amplificação do gene para a combinação F2XR1 no ciclo 24. No entanto, a amplificação foi observada a partir do ciclo 28. Neste ponto, o controle demonstrou uma produção de cerca de 5,8 vezes mais cópias de genes em comparação com a amostra. No ciclo 32, a quantidade de cópias de genes na amostra foi 1,6 vezes maior em relação ao controle (FIGURA 14).

FIGURA 14. Gel de agarose 3% (m/v) comparando da PCR semiquantitativa realizada para as amostras (R) AVR2-3 e o ALS



Na análise da PCR semiquantitativa da amostra AVR2, observou-se a detecção da amplificação a partir do ciclo 24. Nesse ponto, a quantidade de cópias de genes produzidas pela amostra foi aproximadamente 6,6 vezes maior em relação ao controle. À medida que os ciclos progrediam, a quantidade de cópias de genes diminuiu em relação ao ponto de amplificação inicial. No ciclo 28, a amostra ainda apresentou uma amplificação, resultando em cerca de 1,5 vezes mais cópias de genes do que o controle. No entanto, no ciclo 32, observou-se uma redução na quantidade de cópias de genes produzidas pela amostra, sendo cerca de 1,5 vezes menor em comparação com o controle (FIGURA 15).

FIGURA 15. Gel de agarose 3% (m/v) comparando da PCR semiquantitativa realizada para as amostras (R) AVR2 e o ALS



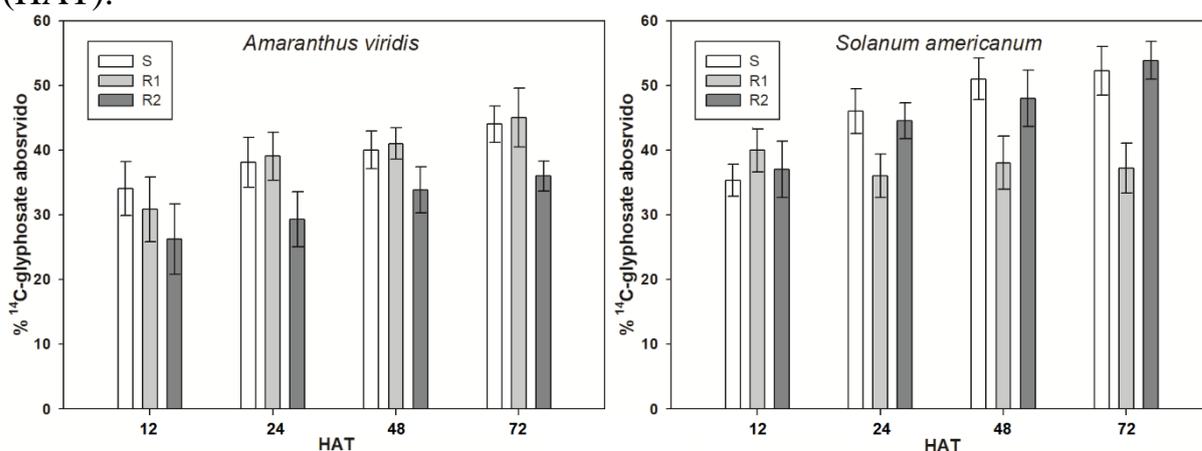
Para a amostra AVR2-3 não houve amplificação do gene para a combinação F2XR1 até o ciclo 24. A partir do ciclo 28, houve amplificação, com o controle demonstrando uma produção de cerca de 5,8 vezes mais cópias de genes em comparação com a amostra. No ciclo 32, a quantidade de cópias de genes na amostra foi 1,6 vezes maior em relação ao controle.

Para a amostra AVR2 a detecção da amplificação começou no ciclo 24, com a quantidade de cópias de genes produzidas pela amostra sendo aproximadamente 6,6 vezes maior em relação ao controle. À medida que os ciclos progrediam, a quantidade de cópias de genes diminuiu em relação ao ponto de amplificação inicial. No ciclo 28, a amostra ainda apresentou uma amplificação, resultando em cerca de 1,5 vezes mais cópias de genes do que o controle. No ciclo 32, observou-se uma redução na quantidade de cópias de genes produzidas pela amostra, sendo cerca de 1,5 vezes menor em comparação com o controle.

6.3.3 Absorção e translocação de glifosato

Absorção e translocação de ^{14}C -glifosato foi avaliado em *A. viridis* e *S. americanum* por ser novos casos de resistência a glifosato no mundo. A absorção de glifosato oscilou de 28 a 34% as 12 HAT em plantas de *A. viridis* e aumento, dependendo da população, em pequenas porcentagens a cada período avaliado, sendo que as 72 HAT a quantidade de ^{14}C -herbicida absorvido oscilava de 35% a 44%. A população R2 apresentou o mesmo padrão de absorção que a população S, no entanto, em todos os horários avaliados a população R1 absorveu em média 5% menos ^{14}C -glifosato. As plantas de *S. americanum* absorveram quantidades semelhantes de herbicida as 12 HAT (~35%), mas a partir das 24 HAT, plantas das populações S e R1 absorveram entre 10 e 15% mais ^{14}C -glifosato que as planta da população R2. Plantas destas populações chegaram a absorver mais de 50% do ^{14}C -glifosato aplicado as 72 HAT (FIGURA 16).

FIGURA 16. Absorção de ^{14}C -glifosato em populações resistentes (R) e susceptíveis (S) de *A. viridis* e *S. americanum* das 12 às 72 h após tratamento (HAT).



A translocação de ^{14}C -glifosato diferiu entre populações de *A. viridis* como de *S. americanum*. Das 12 às 24 HAT, as quantidades de ^{14}C -

herbicida translocado foi semelhante entre as populações de *A. viridis*; no entanto, a partir das 48 HAT, a população R2 reteve a maior quantidade de ^{14}C -glifosato nas folhas tratadas translado menos do 30% ao resto de planta (23%) e raízes (7.5%), enquanto plantas das populações R1 e R2 translocaram mais de 50% do herbicida fora da folha tratada. As plantas de *S. americanum* translocaram grandes quantidades de ^{14}C -herbicida da folha tratada ao resto de planta desde as 12 HAT; no entanto, a população R1 reteve mais herbicida na folha tratada a partir das 48 HAT, o que se viu refletido na menor quantidade de ^{14}C -glifosato translocado ao resto de planta e raízes em plantas desta população em comparação com plantas das populações S e R2 (TABELA 5 e FIGURA 17).

TABELA 6. Translocação de ^{14}C -glifosato das 12 às 72 horas após o tratamento (HAT) em plantas de populações de *A. viridis* e *S. americanum* suscetíveis e resistentes ao glifosato

HAT	População	Translocação (% do ^{14}C -glifosato absorvido)		
		Folha tratada	Resto de planta	Raiz
<i>Amaranthus viridis</i>				
12	S	79,2 ± 5,9	13,9 ± 2,9 a	7,0 ± 3,2
	R1	85,4 ± 2,6	9,2 ± 0,7 b	5,4 ± 2,8
	R2	84,5 ± 4,4	9,9 ± 2,7 ab	5,6 ± 1,9
24	S	79,9 ± 1,4	15,2 ± 1,6 a	4,9 ± 1,5 ab
	R1	80,3 ± 2,9	12,7 ± 0,7 ab	7,0 ± 2,4 a
	R2	82,2 ± 5,4	13,6 ± 3,6 ab	4,2 ± 2,3 ab
48	S	48,7 ± 4,8 b	41,0 ± 3,8 a	10,4 ± 2,3 a
	R1	48,7 ± 4,7 b	40,0 ± 1,5 a	11,3 ± 3,8 a
	R2	70,6 ± 5,9 a	22,7 ± 3,1 b	6,7 ± 3,3 ab
72	S	49,5 ± 3,1 b	37,7 ± 2,1 a	12,8 ± 2,1 ab
	R1	48,3 ± 5,6 b	37,1 ± 3,7 a	14,6 ± 4,5 a
	R2	67,4 ± 6,1 a	24,7 ± 4,6 b	7,9 ± 2,4 b
<i>Solanum americanum</i>				
12	S	58,1 ± 4,5 a	35,4 ± 3,3 b	6,5 ± 1,3 ab
	R1	40,0 ± 4,1 b	50,4 ± 5,7 a	9,6 ± 3,3 a
	R2	43,6 ± 4,2 b	52,3 ± 4,6 a	4,0 ± 1,4 b
24	S	45,8 ± 4,9 b	45,8 ± 4,8	8,3 ± 1,1
	R1	48,4 ± 4,5 ab	42,4 ± 3,4	9,3 ± 2,7
	R2	52,3 ± 4,9 a	41,6 ± 3,5	6,1 ± 1,0
48	S	38,8 ± 3,0 b	44,5 ± 2,6 b	16,7 ± 0,4 a
	R1	44,4 ± 4,5 a	41,2 ± 4,8 b	14,5 ± 2,6 ab
	R2	40,6 ± 3,0 ab	53,1 ± 3,8 a	6,3 ± 1,1 c
72	S	35,0 ± 4,0 b	48,6 ± 4,9 a	16,4 ± 3,6 a
	R1	52,9 ± 2,8 a	31,1 ± 5,2 b	16,0 ± 3,0 a
	R2	39,1 ± 3,5 b	49,5 ± 4,2 a	11,3 ± 3,1 ab

Médias com letras diferentes dentro de um período de avaliação para uma determinada seção da planta são estatisticamente diferentes a 5% de probabilidade determinada pelo teste de Tukey. ± Erro padrão da média (n = 3).

FIGURA 17. Conjunto de imagens digitais (com fundo cinza) e imagens autorradiográficas (com fundo branco) de ^{14}C -glifosato em plantas suscetíveis e resistentes de (A) *S. Americanum* e (B) *A. viridis*.



6.4 DISCUSSÃO

De maneira geral, mutações que conferem resistência ao glifosato devem ocorrer na região conservada dos genes da EPSPS, que compreende da posição 95 a posição 107 (PADGETTE et al. 1190). Até hoje, se tem descrito mutações nas posições 102, 103 e 106, o que evidencia um cenário de ineditismo para mutação observada na posição 105 nesta pesquisa. A mutação na posição 105, por ocorrer na região conservada do gene da EPSPS junto com uma mutação na posição 106, pode representar uma alteração significativa que

contribui a resistência ao glifosato. Essas mutações confirmam que a resistência dessa espécie é causada por um mecanismo *target site*.

Estudos realizados sobre a resistência ao glifosato na região conservada da EPSPS identificou uma nova variante do gene EPSPS, ELs-EPSPS, com cinco mutações distais (E112V, D142N, T351S, D425G e R496G) que conferiram alta insensibilidade ao glifosato (Xu et al., 2024). Logo, é possível que a mutação encontrada nesse trabalho (posição 105) também confira maior resistência ao glifosato.

A resistência ao glifosato é conferida pela amplificação do gene EPSPS, o que ocasiona maior produção dessa enzima (GAINES et al., 2010). A variação do número de cópias desse gene é um mecanismo de resistência ao glifosato que está se tornando cada vez mais disseminado (FERNÁNDEZ-ESCALADA, 2017). Plantas do gênero *Amaranthus* tem apresentado essa característica a qual confere alto índice de resistência., em especial *Amaranthus tuberculatus* (LORENTZ et al., 2014) e *Amaranthus spinosus* (NANDULA et al., 2014).

A reduzida absorção e translocação de ^{14}C -glifosato na população R2 de *A. viridis* e R1 de *S. americanum* demonstrou que estes mecanismos de resistência do sítio não alvo foram responsáveis de conferir a resistência nestas populações. A absorção reduzida é um mecanismo menor que confere baixos níveis de resistência a herbicidas (MOSS, 2017), mas que, sem dúvida, pode contribuir na resistência ao glifosato. Já a reduzida translocação é um mecanismo mais frequente e melhor caracterizado que se deve ao rápido sequestro e inativação do glifosato no vacúolo (GE et al. 2014; ALCÁNTARA DE LA CRUZ et al. 2021).

6.5 CONCLUSÕES

Com esses resultados foi possível fazer a identificação da resistência a glifosato em *A. viridis* e *S. americanum*, sendo os primeiros casos relatados para estas espécies. A resistência de *A. viridis* se deve a um mecanismo do tipo TSR, visto que foi uma supexpressão que conferiu a resistência ao glifosato a essa espécie. Para a espécie *S. americanum* foi encontrada uma dupla mutação, sendo uma dela na posição 105, ainda não relatada na literatura.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As diversas prospecções de campo realizadas para coletar espécies de plantas daninhas suspeitas de resistência ao glifosato em várias regiões produtoras de citros permitiram identificar a presença de múltiplas espécies resistentes em pomares de citros específicos. Isso ressalta a importância de um manejo integrado de plantas daninhas, onde a falha no controle de uma determinada espécie pode complicar o controle de outras espécies suscetíveis, como observado nos casos de *A. viridis*, *B. pilosa* e *T. decumbens*.

Além disso, os resultados destacam a necessidade urgente de explorar novas estratégias de controle de plantas daninhas e desenvolver novos herbicidas, dada a identificação de resistência ao glifosato em espécies como *A. viridis* e *S. americanum*, representando os primeiros casos relatados no mundo para essas espécies. A resistência em algumas populações dessas espécies envolve mecanismos até então não documentados, como a reduzida absorção e translocação de glifosato, bem como mutações e superexpressão no gene da EPSPS. Essas descobertas enfatizam a importância contínua da pesquisa e do desenvolvimento de novas ferramentas e estratégias para o controle eficaz de plantas daninhas e a preservação da produtividade agrícola.

REFERÊNCIAS

ADEGAS, F. S.; GAZZIERO, D. L. P.; VARGAS, L. Resistência de plantas daninhas a herbicidas: histórico e cenário atual do Brasil. **Revista Plantio Direto**, v. 145/146, p. 1-7, 2015.

Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR). Trade Label of Roundup Original DI. Disponível em: https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2023-02/rounduporiginaldi.pdf. Acesso em: 30 jan. 2024.

ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R.; DOMÍNGUEZ-MARTÍNEZ, P.A.; DA SILVEIRA, H.M.; CRUZ-HIPÓLITO, H.E.; PALMA-BAUTISTA, C.; VAZQUEZ-GARCIA, J.G.; DOMÍNGUEZ-VALENZUELA, J.A.; DE PRADO, R. Management of glyphosate-resistant weeds in Mexican citrus groves: Chemical alternatives and economic viability. **Plants**, v. 8, n. 9, p. 325, 2019.

ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R.; FERNÁNDEZ-MORENO, P.T.; OZUNA, C.V. Target and non-target site mechanisms developed by glyphosate-resistant hairy beggarticks (*Bidens pilosa* L.) populations from Mexico. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 220549, 2016.

ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R.; OLIVEIRA, G.M.; CARVALHO, L.B.; SILVA, M.F.G.F. Herbicide resistance in Brazil: status, impacts, and future challenges. **Pests, weeds and diseases in agricultural crop and animal husbandry production**, p. 1-25, 2020.

AMRHEIN N, DEUS B, GEHRKE P, STEINRUCKEN HC. The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate, II: interference of glyphosate with chorismate formation *in vivo* and *in vitro*. **Plant Physiol**. V. 66, n.5, p. 830-4. 1980.

Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos (CITRUSBR). **Exportações brasileiras de suco de laranja jul/dez 2023**. São Paulo: 2024.

AZEVEDO, F. A., DE ALMEIDA, R. F., MARTINELLI, R., PRÓSPERO, A. G., LICERRE, R., DA CONCEIÇÃO, P. M., ARANTES, A. C. C., DOVIS, V. L., BOARETTO, R. M. E MATTOS JR., D. No-tillage and high-density planting for Tahiti acid lime grafted onto Flying Dragon trifoliolate orange. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, 4, 108. 2020.

BLANCO, H. G.; OLIVEIRA, D. A. Estudos dos efeitos da época de controle do mato sobre a produção de citros e a composição da flora daninha. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 45, n. 1, 1978.

BRACAMONTE, E.; SILVEIRA, H. M. D.; ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R.; DOMÍNGUEZ-VALENZUELA, J. A.; CRUZ-HIPOLITO, H. E.; DE PRADO, R. From tolerance to resistance: Mechanisms governing the differential response to glyphosate in *Chloris barbata*. **Pest management science**, v. 74, n. 5, p. 1118-1124, 2018.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CAETANO, R. S. X.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; VICTORIA FILHO, R. Weed seed bank of a 'Pera' citrus orchard. **Scientia Agricola**, v. 58, p. 509-517, 2001.

CARVALHO, L.B. de; CRUZ-HIPÓLITO, H.; GONZÁLEZ-TORRALVA, F.; ALVES, P.; CHRISTOFFOLETI, P.; PRADO, R. de. Detection of sourgrass (*Digitaria insularis*) biotypes resistant to glyphosate in Brazil. **Weed Science**, v. 59, n. 2, p. 171-176, 2011.

CESCO, V. J. S.; KRENCHINSKI, F. H.; RODRIGUES, D. M.; ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R.; DUKE, S. O.; VELINI, E. D.; CARBONARI, C. A. Glyphosate hormesis effects on the vegetative and reproductive development of glyphosate-susceptible and -resistant *Conyza sumatrensis* biotypes. **Environmental Pollution**, V. 345, 2024,

CHIAVEGATO, L. G. Biologia do ácaro *Brevipalpus phoenicis* em citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 21, n. 8, p. 813-816, 1986.

Cold Spring Harb. Protoc.; 2009; doi:10.1101/pdb.prot5178.

COUPLAND, D.; PEABODY, D. V. Absorption, translocation, and exudation of glyphosate, fosamine, and amitrole in field horsetail (*Equisetum arvense*). **Weed Science**, v. 29, n. 5, p. 556-560, 1981.

CROMARTIE, T.H.; POLGE, N. **Method of Detecting Shikimic Acid**. U.S. Patent 006482654B1, 8 fev. 2002. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US6482654B1/en>. Acesso em: 30 jan. 2024.

DAYAN, F. E.; OWENS, D.K.; CORNIANI, N.; SILVA, F.M.L.; WATSON, S.B.; HOWELL, J.; SHANER, D.L. Biochemical markers and enzyme assays for herbicide mode of action and resistance studies. **Weed Science**, v. 63, n. SP1, p. 23-63, 2015.

DE CARVALHO, L. B.; CRUZ-HIPÓLITO, H.; GONZÁLEZ-TORRALVA, F.; ALVES, P.; CHRISTOFFOLETI, P.; DE PRADO, R. Detection of sourgrass (*Digitaria insularis*) biotypes resistant to glyphosate in Brazil. **Weed Science**, v. 2, pág. 171-176, 2011.

DE PRADO, R. From tolerance to resistance: Mechanisms governing the differential response to glyphosate in *Chloris barbata*. **Pest management science**, v. 74, n. 5, p. 1118-1124, 2018.

DELLA-CIOPPA, G., BAUER, S. C., KLEIN, B. K., SHAH, D. M., FRALEY, R. T., & KISHORE, G. M. Translocation of the precursor of 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 18, p. 6873-6877, 1986.

DOMÍNGUEZ-MENDEZ, R.; ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R.; ROJANO-DELGADO, AM; SILVEIRA, H. M.; PORTUGAL, J.; CRUZ-HIPÓLITO, HE; DE PRADO, R. Stacked traits conferring multiple resistance to imazamox and glufosinate in soft wheat. **Pest Manag. Sci.** 75 , 648–657. 2019.

DUKE, S. O. The history and current status of glyphosate. **Pest management science**, v. 74, n. 5, pág. 1027-1034, 2018.

DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 64, n. 4, p. 319-325, 2008.

DUKE, Stephen O. Glyphosate: environmental fate and impact. **Weed Science**, v. 68, n. 3, p. 201-207, 2020.

EMBRAPA. **Cultura dos Citros. Brasília**: EMBRAPA, 2013. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/979492/1/CULTURA-CITROS-ed01-2013.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2023.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). **Citricultura**. São Paulo. 2021.

Fernández-Escalada, M., Zulet-González, A., Gil-Monreal, M., Zabalza, A., Ravet, K., Gaines, T., Royuela, M. Effects of EPSPS Copy Number Variation (CNV) and Glyphosate Application on the Aromatic and Branched Chain Amino Acid Synthesis Pathways in *Amaranthus palmeri*. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1970, 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.01970.

FERNANDEZ-ESCALADA, M.; GIL-MONREAL, M.; ZABALZA, A.; ROYUELA, M. Characterization of the *Amaranthus palmeri* physiological

response to glyphosate in susceptible and resistant populations. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 1, p. 95-106, 2016.

Food and Agriculture Organization. (2009). **The lurking menace of weeds**. Disponível em: <<http://www.fao.org/news/story/en/item/29402/icode/>>. Acessado em: 06 fev. 2024.

Food and Agriculture Organization. (2021). **FAOSTAT**: Statistical database. Disponível em:<<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>>. Acesso em: 01 fev. 2024.

FRANCISCHINI, A. C.; CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA, R.S., JR.; SANTOS, G.; BRAZ, G.B.P.; DAN, H.A. First report of *Amaranthus viridis* resistance to herbicides. **Planta daninha**, v. 32, p. 571-578, 2014.

FRARE, G. F. **Sobrevivência de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da podridão floral dos citros em plantas daninhas**. 71f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Fitopatologia) –Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

Gaines, T. A., Zhang, W., Wang, D., Bukun, B., Chisholm, S. T., Shaner, D. L., et al. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 3, p. 1029–1034, 2010. DOI: 10.1073/pnas.0906649107.

GAINES, T. A.; DUKE, S. O.; MORRAN, S.; RIGON, C. A.; TRANEL, P. J.; KÜPPER, A.; DAYAN, F. E. Mechanisms of evolved herbicide resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 30, p. 10307-10330, 2020.

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.; et al. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 3, p. 1029-1034, 2010.

GAINES, T.A.; PATTERSON, E.L.; NEVE, P. Molecular mechanisms of adaptive evolution revealed by global selection for glyphosate resistance. **New Phytologist**, v. 223, n. 4, p. 1770-1775, 2019.

GALLI, AJB; MONTEZUMA, MC. **Glifosato**: Alguns aspectos da utilização do Herbicida Glifosato na Agricultura. ACADCOM, 2005.

GARCÍA, M. J.; PALMA-BAUTISTA, C.; ROJANO-DELGADO, A.M.; BRACAMONTE, E.; PORTUGAL, J.; LA CRUZ, R.A.-D.; DE PRADO, R. The triple amino acid substitution TAP-IVS in the EPSPS gene confers high

glyphosate resistance to the superweed *Amaranthus hybridus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 2396, 2019.

GE X, D'AVIGNON DA, ACKERMAN JJ, SAMMONS RD. *In vivo* 31P-nuclear magnetic resonance studies of glyphosate uptake, vacuolar sequestration, and tonoplast pump activity in glyphosate-resistant horseweed. **Plant Physiol.** 166, 1255–1268. 2014.

GIACOMINI, D.A.; WESTRA, P.; WARD, S.M. Variable inheritance of amplified EPSPS gene copies in glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). **Weed Science**, v. 67, n. 2, p. 176-182, 2019.

HASLAM, R.J.; KOIDE, H. B.; HEMMING, B. A. Pleckstrin domain homology. **Nature**, v. 363, n. 6427, p. 309-310, 1993.

Heap, I. (2024). The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponível em: <www.weedscience.org>. Acesso em: 21 jan. 2024.

HEAP, I. Criteria for confirmation of herbicide-resistant weeds-with specific emphasis on confirming low level resistance. **International survey of herbicide resistant weeds**, 2005.

<<http://www.weedscience.org/Documents/ResistanceCriterion.pdf>>. Acesso em: 18 jun 2024.

HEAP, I. Global perspective of herbicide-resistant weeds. **Pest Management Science**, 70: 1306–1315, 2014.

Heap, I. The International Herbicide-Resistant Weed Database. Disponível em: www.weedscience.org. Acesso em: 23 fev. 2024.

HEAP, I. **The International Herbicide-Resistant Weed Database**. Disponível em: <http://www.weedscience.org>. Acesso em: 30 jan 2024.

HERRMANN, K. M. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 907, 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção agropecuária: laranja, safra de 2022**. Rio de Janeiro: IBGE, 2022.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Produção Agrícola Municipal**. 2017. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1613&z=p&o=18&i=p>. Acesso em: 14 mar. 2024.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [IBGE]. **Produção Agrícola Municipal**. 2017.

<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1613&z=p&o=18&i=p>. Acesso em 2 fev 2024.

Instituto Capixaba de Pesquisa (INCAPER). **Simpósio Incaper Pesquisa – SIP 2023**. ANAIS 2023. Volume 3. Janeiro de 2024. DOI: 10.54682/sip.v3.

JABLONKAI, I. Molecular mechanism of action of herbicides. **Herbicides – Mechanisms and Mode of Action**, 2011.

KIRKWOOD, R. C.; MCKAY, I. Accumulation and elimination of herbicides in select crop and weed species. **Pestic. Sci.**, v. 42, p. 241-249, 1994.

KÜPPER, A.; BORGATO, E.A.; PATTERSON, E.; NETTO, A.G.; NICOLAI, M.; DE CARVALHO, S.J.P.; NISSEN, S.J.; GAINES, T.A.; CHRISTOFFOLETI, P. Multiple resistance to glyphosate and acetolactate synthase inhibitors in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) identified in Brazil. **Weed Science**, v. 65, n. 3, p. 317-326, 2017.

LOPES, J.M.S; DÉO, T.F.G; ANDRADE, B.J.M; GIROTO, M.; FELIPE, A.L.S.; JUNIOR, C.E.I.; BUENO, C.E.M.S.; SILVA, T.F.; LIMA, F.C.C. Importância Econômica do Citros no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, n. 20, dez. 2011.

Lorentz, L., Gaines, T. A., Nissen, S. J., Westra, P., Streck, H. J., Dehne, H. W., et al. Caracterização da resistência ao glifosato em populações de *Amaranthus tuberculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 8134–8142, 2014. DOI: 10.1021/jf501040x.

LORENTZ, L.; GAINES, T.A.; NISSEN, S.J.; WESTRA, P.; STREK, H.J.; DEHNE, H.W.; RUIZ-SANTAELLA, J.P.; BEFFA, R. Characterization of glyphosate resistance in *Amaranthus tuberculatus* populations. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 32, p. 8134-8142, 2014.

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

MARTINELLI, L.R. RUFINO, A.C. DE MELO, R. ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, M.F.G.F. DA DAS SILVA, J.R. DA SILVA, R.M. BOARETTO, P.A. MONQUERO, D. MATTOS, F.A. DE AZEVEDO. Glyphosate excessive use chronically disrupts the shikimate pathway and can affect photosynthesis and yield in citrus trees. **Chemosphere**, 308. 2022.

Martinelli, R., Rufino, L. R., Jr., Alcántara-de la Cruz, R., da Conceição, P. M., Monquero, P. A., de Azevedo, F. A. Glyphosate excessive use affects citrus

growth and yield: the vicious (and unsustainable) circle in Brazilian orchards. **Agronomy**, v. 12, n. 2, p. 453, 2022.

MARTINELLI, R.; MONQUERO, P.A.; FONTANETTI, A.; CONCEIÇÃO, P.M.; AZEVEDO, F.A et al. Ecological mowing: An option for sustainable weed management in young citrus orchards. **Weed Technology**, v. 31, n. 2, p. 260-268, 2017.

MARTINS, V. A. et al. **Previsões e Estimativas das Safras Agrícolas do Estado de São Paulo**, Ano Agrícola 2022/23, Fevereiro de 2023. Análises e Indicadores do Agronegócio, São Paulo, v. 18, n. 5, maio 2023, p. 1-15.

Disponível em:

<http://www.iea.agricultura.sp.gov.br/out/TerTexto.php?codTexto=16141>.

Acesso em: 10 fev. 2024.

MENSINK, H; JANSSEN, P. **Glyphosate World Health Organization**. Geneva, 1994.

MONQUERO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; OSUNA, M. D.; DE PRADO, R. A. Absorption, translocation and metabolism of glyphosate by plants tolerant and susceptible to this herbicide. **Planta Daninha**, v. 22, p. 445-451, 2004.

MOREIRA, M. S.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S.J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Glyphosate-resistance in *Conyza canadensis* and *C. bonariensis*. **Planta Daninha**, v. 25, p. 157-164, 2007.

MOSS S. Herbicide resistance weeds. In: HATCHER, P.E., FROUD-WILLIAMS, R.J. (Eds.), **Weed Research: Expanding Horizons**. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, pp. 181–214. 2017.

MYERS JP, ANTONIOU MN, BLUMBERG B, CARROLL L, COLBORN T, EVERETT LG, MICHAEL HANSEN, LANDRIGAN PJ, LANPHEAR BP, MESNAGE R, VANDENBERG LN, VOM SAAL FS, WELSHONS WV, BENBROOK CM. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. **Environmental Health**, 2016, 15:19, DOI: 10.1186/s12940-016-0117-0.

Nandula, V. K., Wright, A. A., Bond, J. A., Ray, J. D., Eubank, T. W., Molin, W. T. Amplificação de EPSPS em amaranto espinhoso resistente a glifosato (*Amaranthus spinosus*): um caso de transferência de genes via hibridação interespecífica de amaranto Palmer resistente a glifosato (*Amaranthus palmeri*). **Pest Management Science**, v. 70, p. 1902–1909, 2014.

NANDULA, V. K.; RAY, J.D.; RIBEIRO, D.N.; PAN, Z.; REDDY, K.N. Glyphosate resistance in tall waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from

Mississippi is due to both altered target-site and nontarget-site mechanisms. **Weed Science**, v. 61, n. 3, p. 374-383, 2013.

NUNES, M. A. **Transmissão do vírus da leprose dos citros por *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (acari: Tenuipalpidae) para plantas associadas a pomares cítricos**. 67f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2007.

ORCARAY, L., Z., A.; ZABALZA, A.; ROYUELA, M. Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide glyphosate. **Journal of plant physiology**, v. 169, n. 1, p. 27-33, 2012.

Padgett, S., et al. Site-directed mutagenesis of a conserved region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase active site. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 22364–22369, 1991.

PARROT, F.; BEDRY, M. D. R.; GARRIGUES, J. C. F. Glyphosate herbicide poisoning: use of a routine aminoacid analyzer appears to be a rapid method for determining glyphosate and its metabolite in biological fluids. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 33, n. 6, p. 695-698, 1995.

RAIMONDI, M. A.; OLIVEIRA, J.R.; CONSTANTIN, J.; RIOS, F.; GEMELLI, A.; RAIMONDI, R. Dose-response curve to soil applied herbicides and susceptibility evaluation of different *amaranthus* species using model identity. **Planta daninha**, v. 33, p. 137-146, 2015.

RIGGINS, C.W.; PENG, Y.H.; STEWART, C.N.; TRANEL, P.J. Characterization of de novo transcriptome for waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) using GS-FLX 454 pyrosequencing and its application for studies of herbicide target-site genes. **Pest management science**, v. 66, n. 10, p. 1042-1052, 2010.

RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-response analysis using R. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0146021, 2015.

SALAS, R. A.; SCOTT, R.C.; DAYAN, F.E.; BURGOS, N.R. EPSPS Gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne ssp. multiflorum*) populations from Arkansas (United States). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 25, p. 5885-5893, 2015.

SAMMONS, R. D.; GAINES, T. A. Glyphosate resistance: state of knowledge. **Pest management science**, v. 70, n. 9, p. 1367-1377, 2014.

SATCHIVI, N. M.; WAX, L. M.; STOLLER, E. W.; BRISKIN, D. P. Absorption and translocation of glyphosate isopropylamine and

trimethylsulfonium salts in *Abutilon theophrasti* and *Setaria faberi* **Weed Sci.**, v. 48, p. 675-679, 2000.

SELLERS, B. A.; SMEDA, R.J.; JOHNSON, W.G.; KENDIG, J.A.; ELLERSICK, M.R. Comparative growth of six *Amaranthus* species in Missouri. **Weed Science**, v. 3, p. 329-333, 2003.

SHANER, D. L. Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. **Weed Science**, v. 57, n. 1, p. 118-123, 2009.

SHANER, D. L.; NADLER-HASSAR, T.; HENRY, W.B.; KOGER, C.H. A rapid *in vivo* shikimate accumulation assay with excised leaf discs. **Weed Science**, v. 53, n. 6, p. 769-774, 2005.

SILVA, A. F.; BATISTA, A. C.; SILVA, R. S.; BATISTA, A. C.; SILVA, R. S. **Dispersão de plantas daninhas resistentes a glifosato no Brasil: recomendações de manejo.** 2023.

SINGH, M.; SHARMA, S. D. Benefits of triazine herbicides and other weed control technology in citrus management. **The triazine herbicides: 50 years of revolutionizing agriculture**, p. 199-210, 2008.

SZÉKÁCS, A.; DARVAS, B. Forty years with glyphosate. **Herbicides-properties, synthesis and control of weeds**, v. 14, p. 247-284, 2012.

TAKANO, H. K.; OLIVEIRA, R.S., JR.; CONSTANTIN, J.; BRAZ, G.B.P.; GHENO, E.A. Goosegrass resistant to glyphosate in Brazil. **Planta Daninha**, v. 35, p. e017163071, 2017.

TALON, M., CARUSO, M., GMITTER JR, F. G. **The Genus Citrus.** Elsevier: United States. 513 p. 2020.

THOMAS, W. E.; BURKE, I.C.; SPEARS, J.F.; WILCUT, J.W. Influence of environmental factors on slender amaranth (*Amaranthus viridis*) germination. **Weed science**, v. 54, n. 2, p. 316-320, 2006.

U.S. Department of Agriculture [USDA]. **Citrus: World Markets and Trade.** <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf> Acesso em: março 2024.

VÁZQUEZ-GARCÍA, J. G.; CASTRO, P.; TORRA, J.; ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R.; DE PRADO, R. Resistance evolution to EPSPS inhibiting herbicides in false barley (*Hordeum murinum*) harvested in Southern Spain. **Agronomy**, v. 10, n. 7, p. 992, 2020.

VENCILL, W. K.; NICHOLS, R. L.; WEBSTER, T. M.; SOTERES, J. K.; MALLORYSMITH, C.; BURGOS, N. R.; JOHNSON, W. G.; MCCLELLAND,

M. R. Herbicide resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops. **Weed Science**, v. 60, n. SP1, p. 2-30, 2012.

WANAMARTA, G. D.; PENNER, D. Foliar absorption of herbicides. **Weed Sci.**, v. 4, p. 215-231, 1989.

Xu, R., Bao, Y., Jiao, F., Li, M., Zhang, X., Zhang, F., & Guo, J. Unraveling the atomic mechanisms underlying glyphosate insensitivity in EPSPS: implications of distal mutations. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, p. 1–12, 2024. Publicação online antecipada.

YAMADA, T.; CASTRO, P. R. C. Glifosato, herbicida com singular modo de ação: efeitos secundários e implicações fisiológicas e agronômicas. In: **Simpósio Sistema Agrícola Sustentável com Colheita Econômica Máxima**. Brasil, 2004.

YU, Q.; JALALUDIN, A.; HAN, H.; CHEN, M.; SAMMONS, R.D.; POWLES, S.B. Evolution of a double amino acid substitution in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Eleusine indica* conferring high-level glyphosate resistance. **Plant physiology**, v. 167, n. 4, p. 1440-1447, 2015.