

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Dissertação

**Elucidação de mecanismos de resistência de *Cyperus iria* e
Echinochloa colona a herbicidas**

Diego Martins Chiapinotto

Pelotas, 2020

Diego Martins Chiapinotto

**Elucidação de mecanismos de resistência de *Cyperus iria* e
Echinochloa colona a herbicidas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fitossanidade (área do conhecimento: Herbologia).

Orientador: Ph.D. Edinalvo Rabioli Camargo

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C532e Chiapinotto, Diego Martins

Elucidação de mecanismos de resistência de *Cyperus iria* e *Echinochloa colona* a herbicidas / Diego Martins Chiapinotto ; Edinalvo Rabaioli Camargo, orientador. — Pelotas, 2020.

103 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Absorção-translocação. 2. Capim-arroz. 3. Glifosato. 4. Junquinho. 5. Sequenciamento da ALS. I. Camargo, Edinalvo Rabaioli, orient. II. Título.

CDD : 633.2

Diego Martins Chiapinotto

**Elucidação de mecanismos de resistência de *Cyperus iria* e
Echinochloa colona a herbicidas**

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Fitossanidade, Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 02 de março de 2020

Banca examinadora:

Prof. Dr. Edinaldo Rabaioli Camargo (Orientador)
Ph.D. em Agronomia pela Texas A&M University

Prof. Dr. Carlos Eduardo Schaedler
Doutor em Fitossanidade pela Universidade Federal de Pelotas

Pesquisador Dr. André Andres
Ph.D. em Sciences and Innovative Technologies pela Universidade Degli Studi di Torino

Dra. Vívian Ebeling Viana
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Aos meus progenitores, pela dádiva da vida. Especialmente meu pai, por me ensinar a “tirar água de pedra” e pelo incentivo em cursar Agronomia.

Ao professor Dr. Carlos Schaedler pelo incentivo em continuar os estudos e ingressar no mestrado.

Ao professor Ph.D. Edinalvo Rabaioli Camargo pelas preciosas orientações nesse percurso, por agilizar a realização dos estudos e zelo em acompanhar as atividades desenvolvidas.

Ao professor Ph.D. Luis Antono de Avila por constantemente suscitar novas inquietações e sugestões de trabalhos.

Ao professor Dr. Sylvio Bidel Dornelles por fornecer material vegetal para os estudos com capim-arroz.

Aos colegas do Centro de Estudos em Herbologia (CEHERB), especialmente Vinícios Geherke pelo treinamento do programa R e estudos em HPLC; Vívian Viana, Lariza Benedetti e Cristiano Piasecki, na condução dos estudos de base molecular. Aos estagiários Victor Tarrillo e Andrine Böhlke, na condução dos estudos em casa de vegetação. À Bruna Ceolin pelo incentivo e contribuição nas disciplinas. Ao Marcus Fipke pela organização do 35. À professora Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos (Laboratório de Citogenética Vegetal – UFRGS) pela enorme atenção e disposição nos estudos de citometria de fluxo.

Agradecimento especial à Amanda Garcez pela paciência, compreensão, carinho e zelo, nos últimos tempos.

“Deixa eu querer voar, enfrentar meus problemas
Eu mirei na Lua e acabei acertando as estrelas”.
(Vitor Kley, 2019)

Resumo

CHIAPINOTTO, Diego Martins. Elucidação de mecanismos de resistência de *Cyperus iria* e *Echinochloa colona* a herbicidas. Orientador: Edinalvo Rabaioli Camargo. 2020. 103p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

A resistência de plantas daninhas a herbicidas ocorre por grande variedade de mecanismos, que são agrupados em dois: os mecanismos relacionados ao local de ação (TSR) e os mecanismos não relacionados ao local de ação (NTSR). A maioria dos casos, relacionados aos herbicidas inibidores da ALS, ocorre por alterações pontuais na enzima, causando elevados níveis de resistência. Porém, a metabolização herbicida, pode ocorrer concomitante. A resistência ao glifosato envolve ambos os mecanismos (TSR e NTSR) e, em casos específicos, é condicionada pela temperatura. Condições de umidade do solo e estágio de desenvolvimento da planta podem afetar a eficiência desse herbicida. O capítulo I teve por objetivos o sequenciamento da enzima ALS em *C. iria* resistente (CYPIR-R) e suscetível (CYPIR-S), bem como avaliar evidências de metabolização herbicida por meio de curvas dose-resposta com uso de malathion (1000 g i.a. ha⁻¹). No Capítulo II, os objetivos foram: avaliar se temperaturas elevadas condicionam a resistência de *E. colona* supostamente resistente (ECHCO-SR) e suscetível (ECHCO-S); avaliar a absorção/ translocação diferencial entre biótipos (estudos em HPLC e inibidores de transportadores ABC - sodium ortho-vanadate e verapamil). No Capítulo III, o objetivo foi avaliar a eficácia do glifosato em biótipos de ECHCO-SR e ECHCO-S submetidos a diferentes condições de umidade do solo e estágios de desenvolvimento. No estudo I, o cromatograma do DNA evidenciou a presença de picos duplos na terceira base de nucleotídeos na posição Asp₃₇₆, indicando mutação de aspartato (GAC) para glutamina (GAG), causado pelo nível de ploidia, presença de alelos ou duplicação gênica da enzima. O malathion sinergizou o controle de bispyribac-sodium no biótipo resistente. Assim, há evidências de mutação e metabolização na resistência cruzada de *C.iria*. No estudo II, constatou-se que a temperatura de 36-32 °C aumenta a dose de controle com glifosato em 2-5x para ambos os biótipos de ECHCO, comparado com a temperatura de 28-25 °C. No entanto, ECHCO-SR é capaz de sobreviver à dose acima da máxima recomendada, causando problemas práticos, tais como sobrevivência de plantas e, consequentemente, redução na produtividade da cultura. Estudos em HPLC indicam absorção/ translocação diferencial entre biótipos. Além disso, o pré-tratamento com inibidores de transportadores ABC reduz a dose de controle de ECHCO-SR. Dessa forma, sugere-se resistência condicionada pela temperatura. No capítulo III, constatou-se que solo saturado e estágios avançados de desenvolvimento reduzem a eficácia do glifosato em *E. colona*.

Palavras-chave: absorção/ translocação, capim-arroz, glifosato, junquinho, resistência condicional, sequenciamento da ALS.

Abstract

CHIAPINOTTO, Diego Martins. Elucidation of resistant mechanisms of *Cyperus iria* and *Echinochloa colona* to herbicides. Advisor: Edinalvo Rabaioli Camargo 2020. 103p. Dissertation (Master's Degree) – Crop protection Graduate Program, Crop Protection Department, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2020.

Weed resistance to herbicides occurs through a wide range of mechanisms, which are grouped into two: the target-site resistance mechanisms (TSR) and non-target-site resistance mechanisms (NTSR). The most cases, related to ALS-inhibiting herbicides, occur due to specific alterations in the enzyme, causing high levels of resistance. However, herbicide metabolism may occur concomitantly. Glyphosate resistance involves both mechanisms (TSR and NTSR) and, in specific cases, is conditioned by temperature. Soil moisture conditions and plant growth stage can affect the efficiency of this herbicide. The Chapter I aimed at sequencing the ALS enzyme in *C. iria* resistant (CYPIR-R) and susceptible (CYPIR-S) biotypes as well as evaluate evidence of herbicide metabolism through dose-response curve using malathion (1000 g a.i. ha⁻¹). In chapter II, the aims were: to assess whether different temperatures condition resistance in *E. colona* supposed resistant (ECHCO-SR) and susceptible (ECHCO-S) biotypes; to evaluate differential absorption/ translocation among biotypes (by HPLC and ABC transporter inhibitors - sodium ortho-vanadate and verapamil). In Chapter III, the aim was to evaluate the efficacy of glyphosate in ECHCO-SR and ECHCO-S biotypes under different soil moisture conditions and plant growth stages. In study I, the DNA chromatogram showed the presence of double peaks in the third nucleotide base at the Asp376 position, indicating aspartate mutation (GAC) to glutamine (GAG), caused by the level of ploidy, presence of alleles or gene duplication. Malathion synergized the control of bispyribac-sodium on the resistant biotype. Thus, there is evidence of related mutation and metabolism in *C.iria* cross-resistance. In study II, it was found that the temperature of 36-32 ° C increases the control rate with glyphosate by 2-5x for both ECHCO biotypes, compared to the temperature of 28-25 °C. However, ECHCO-SR is capable to survive the glyphosate rate above the recommended maximum, leading to practical problems, such as plant survival and, consequently, reduction in crop productivity. HPLC studies indicate differential absorption/ translocation among biotypes. In addition, pretreatment with ABC carrier inhibitors reduces the control dose of ECHCO-SR. Thus, temperature-conditioned resistance is suggested. In Chapter III, it was found that saturated soil conditions and advanced growth stage reduce the efficacy of glyphosate in *E. colona*.

Keywords: absorption/ translocation, ALS sequencing, conditional resistance, glyphosate, junglerice, rice flatsedge.