

## RESISTÊNCIA MÚLTIPLA AOS HERBICIDAS CYHALOFOP-BUTYL E IMAZETHAPYR EM *Echinochloa crus-galli* NO RIO GRANDE DO SUL

Luan Cutti<sup>1</sup>, Carlos Alberto Gonsiorkiewicz Rigon<sup>2</sup>, Walker Schaidhauer<sup>2</sup>, Estéfani Sulzbach<sup>3</sup>, Enrico Zilch Pajares Ferreira<sup>3</sup>, Paula Sinigaglia Angonese<sup>3</sup>, Catarine Markus<sup>4</sup>, Aldo Merotto Junior<sup>4</sup>.

Palavras-chave: metabolização, mutação, glutathiona-s-transferase, P450

### INTRODUÇÃO

A ocorrência da resistência de capim-arroz aos herbicidas inibidores da ALS é amplamente distribuída nas lavouras de arroz. Na safra 2011/12 foram avaliadas 421 populações de capim-arroz, oriundas de diversas regiões do estado do Rio Grande do Sul, das quais 60% foram caracterizadas como resistentes a imazethapyr + imazapic, 19% resistentes ao quinclorac e 14% com resistência múltipla aos inibidores da enzima ALS + quinclorac, não sendo verificada resistência aos herbicidas inibidores da ACCase (MATZENBACHER et al., 2014). Assim, a solução para o controle do capim-arroz em grande parte dessas lavouras é a utilização de herbicidas ACCase. No Brasil a aplicação contínua desses herbicidas propiciou a evolução da resistência, de forma similar ao que já ocorre em diversos países (RUIZ-SANTAELLA et al., 2006; WRIGHT et al., 2016). Corroborando com isso, recentemente foi descrita a resistência de *Echinochloa crus-galli* ao herbicida cyhalofop-butyl no estado de Santa Catarina, Brasil, no entanto sem elucidação do mecanismo (EBERHARDT et al., 2016), e no Rio Grande do Sul resistência ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl devido à presença do protetor isoxadifen-ethyl na formulação (CUTTI et al., 2018). O objetivo desse trabalho foi avaliar a resistência de *E. crus-galli* ao herbicida cyhalofop-butyl e imazethapyr, e elucidar o mecanismo de resistência.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Curva de dose-resposta a cyhalofop-butyl

O experimento foi conduzido em casa de vegetação climatizada, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de fev/mar de 2019. Foram utilizados um biótipo de *Echinochloa crus-galli* potencialmente resistente coletado no município de São Jerônimo-RS (SAOJER-01), e um suscetível coletado em Mostardas do Sul-RS (MOSTS-01). As sementes foram germinadas e transplantadas em vasos plásticos, com volume de 200 mL. Realizou-se a aplicação do herbicida cyhalofop-butyl (Clincher) nas doses 0 a 304 g e.a. ha<sup>-1</sup> para o biótipo suscetível, e 0 a 608 g e.a. ha<sup>-1</sup> para o biótipo resistente, sendo adicionado adjuvante VegetOil (2L ha<sup>-1</sup>). A aplicação dos herbicidas foi realizada em câmara de aspersão automatizada, volume de calda foi de 200 L ha<sup>-1</sup>, em plantas em estágio de 3-4 folhas. A aplicação do inibidor de metabolização de enzimas GST, 4-Chloro-7-nitrobenzofurazan (NDB-Cl), ocorreu 48 horas antes da aplicação do herbicida, na dose de 270 g ha<sup>-1</sup> diluído em acetona, em volume de calda 200 L ha<sup>-1</sup> (Wright et al., 2016). A aplicação do malathion, inibidor de enzimas P450, foi realizada duas horas antes da aplicação do herbicida na dose de 1000 g ha<sup>-1</sup> e volume de calda 200 L ha<sup>-1</sup>. Cada tratamento possuiu cinco repetições.

A avaliação de controle foi realizada aos 21 dias após a aplicação dos tratamentos (DAA) utilizando-se uma escala percentual visual, na qual 0% corresponde ausência de injúrias e 100% significa morte da planta. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e havendo significância foram ajustados pelo modelo de regressão não-linear log-logístico de três parâmetros:  $y = a / (1 + (x/x_0)^b)$ . Os dados de controle visual foram transformados  $(\sqrt{x+1})$  para

<sup>1</sup> Doutorando em Fitotecnia, UFRGS, Av. Jerônimo de Ornelas 135, apto 33, Porto Alegre-RS, luancutti@hotmail.com;

<sup>2</sup> Mestrando em Fitotecnia, UFRGS, ca\_rigon@hotmail.com, wschaidhauer@hotmail.com;

<sup>3</sup> Graduando em Agronomia, UFRGS, estefanisulzbach@gmail.com, enricozpferreira@gmail.com; paulasangonese@gmail.com;

<sup>4</sup> Professores, doutores, UFRGS, aldo.merotto@ufrgs.br, catarine.markus@ufrgs.br

atenderem os pressupostos da ANOVA. Para a determinação dos valores de  $C_{50}$  e  $y$  da equação foi substituído por 50 (50% de controle).

### **Resistência a imazethapyr**

O experimento foi realizado com o herbicida imazethapyr (Imzetapir Plus Nortox) nas doses de 100 e 200 g ha<sup>-1</sup> de imazethapyr no biótipo suscetível (MOSTS-01) e no potencialmente resistente (SAOJER-01). Cada tratamento consistiu de cinco repetições, e avaliou-se a sobrevivência aos 21 DAA. As condições de condução e aplicação são as mesmas citadas acima.

### **Sequenciamento dos genes codificadores das enzimas ACCase e ALS**

O material vegetal foi coletado no estádio de 3-4 folhas dos biótipos em estudo. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e após extraiu-se o RNA (protocolo do reagente Concert), síntese de cDNA (enzima M-MLV), amplificação dos primers através de PCR, e purificação das amostras para o sequenciamento (ExoSap). O gene da enzima ALS foi completamente sequenciado através de seis primers, enquanto o gene da enzima ACCase foi sequenciado parcialmente o domínio carboxyl-transferase (CT) com três primers.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O biótipo SAOJER-01 apresentou resistência ao herbicida cyhalofop-butyl, resultando em um fator de resistência superior a 37 (Figura 1A; Tabela 1). A dose máxima de herbicida utilizada, 608 g e.a. ha<sup>-1</sup> não alcançou 50% de controle para o biótipo resistente. O uso de inibidores de enzimas relacionadas à metabolização de herbicidas apresentaram efeito na redução dos fatores de resistência. A aplicação prévia de inibidor de enzimas P450 reduziu o fator de resistência para aproximadamente 9, enquanto que a aplicação de inibidor de enzimas GST para 1,77 (Figura 1B e 1C; Tabela 1). A resistência de plantas daninhas a herbicidas inibidores da enzima ACCase deve-se principalmente pela presença de mutação no gene codificador da enzima e/ou pela ação de enzimas de detoxificação. Em capim-arroz os casos de resistência a esses herbicidas são, geralmente, devido ao incremento de metabolização, sendo as enzimas GST as principais responsáveis (RUIZ-SANTAELLA et al., 2006).

O biótipo SAOJER-01 apresentou sobrevivência quando aplicado 100 e 200 g ha<sup>-1</sup> de imazethapyr, com fitointoxicação visual inferior a 50%, enquanto que o biótipo suscetível morreu (dados não apresentados). Os principais mecanismos de resistência a herbicidas inibidores da enzima ALS em capim-arroz são mutação no gene alvo e/ou superexpressão de enzimas de metabolização (MATZENBACHER et al., 2014). Neste estudo o uso de inibidores de metabolização não foi realizado.

A análise do sequenciamento do gene codificador da enzima ACCase não apresentou mutação no biótipo resistente SAOJER-01 quando comparado com o biótipo suscetível MOSTS-01 (Figura 2). Contudo, foi verificada mutação no gene ALS na posição 574, havendo uma substituição de um triptofano (Trp) por uma leucina (Leu) (Figura 3).

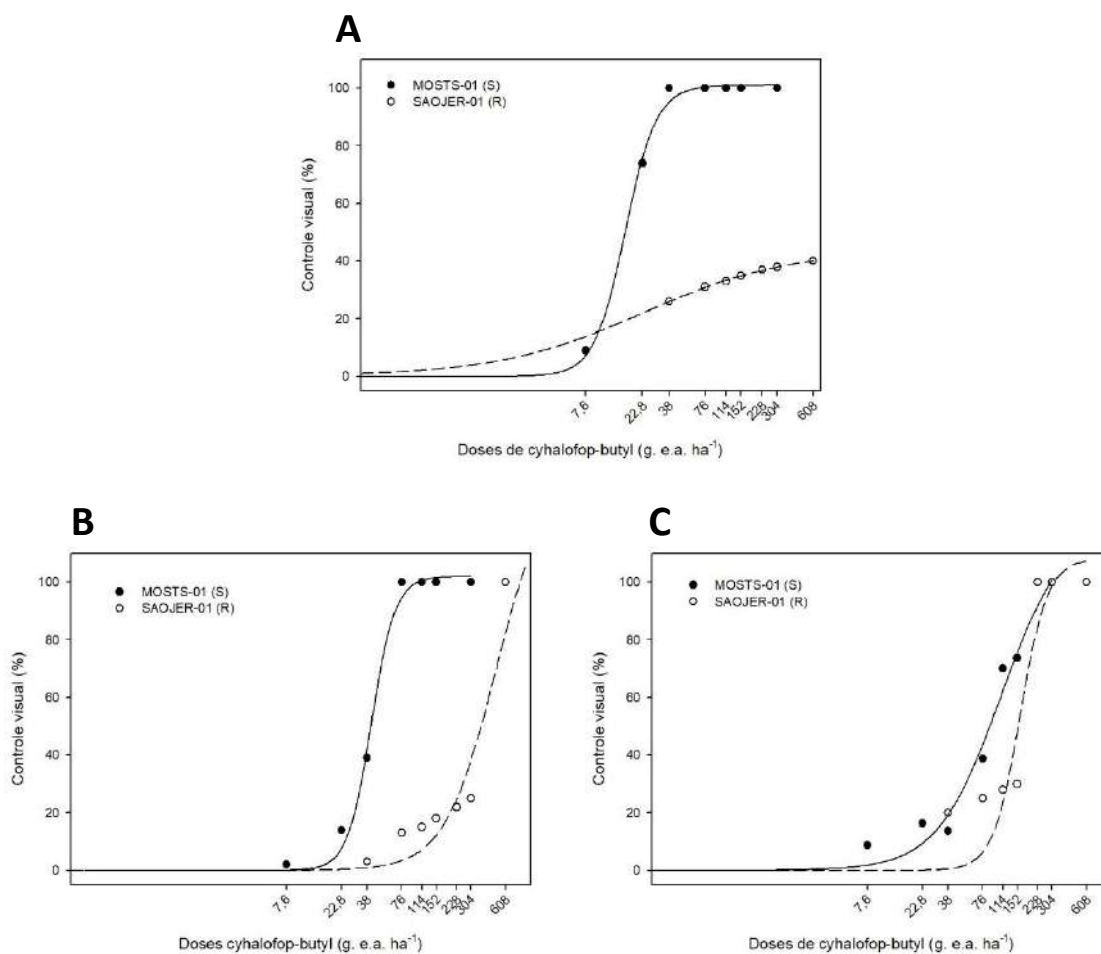


Figura 1. Controle visual aos 21 DAA de capim-arroz, após aplicação de cyhalofop-butyl isolado (A), e com aplicação prévia de malathion (B) e NBD-Cl (C).

Tabela 1 . Parâmetros da equação log-logística para a variável controle visual 21 DAA de dois biótipos de capim-arroz, MOSTS-01 (S) e SAOJER-01 (R) após aplicação de cyhalofop-butyl isolado , e com aplicação prévia de malathion e NBD-Cl.

	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>X0</i>	<i>C</i> <sub>50</sub> <sup>1</sup>	FR <sup>2</sup>
-----Sem inibidor-----					
MOSTS-01 (S)	100,991*	-3,329*	16,339*	16,24	-
SAOJER-01 (R)	43,993*	-0,708*	22,649*	> 608,00	> 37,44
-----Malathion (inibidor P450)-----					
MOSTS-01 (S)	101,987*	-4,199*	41,284*	40,90	-
SAOJER-01 (R)	137,929*	-1,959*	496,011 <sup>ns</sup>	371,83	9,09
-----NBD-Cl (inibidor GST)-----					
MOSTS-01 (S)	120,725*	-1,572*	108,988*	87,41	-
SAOJER-01 (R)	108,086*	-3,684 <sup>ns</sup>	160,957*	154,54	1,77

<sup>1</sup>Dose para controle de 50%; <sup>2</sup>Fator de resistência.

	Iso1781	Trp1999	Trp2027	Iso2041
<b>MOSTS-01 (S)</b>	CAGAT <b>AT</b> ACATGG	AAGTG <b>TGG</b> TTCCC	CTAACT <b>TGG</b> AGAGAG	AAGGG <b>ATT</b> CTTCA
<b>SAOJER-01 (R)</b>	CAGAT <b>AT</b> ACATGG	AAGTG <b>TGG</b> TTCCC	CTAACT <b>TGG</b> AGAGAG	AAGGG <b>ATT</b> CTTCA
	Asp2078	Cis2088	Gli2096	
<b>MOSTS-01 (S)</b>	TGGTT <b>GAT</b> AGCAA	TTGAG <b>TGT</b> TATGC	CGAAAG <b>GCA</b> ATGT	
<b>SAOJER-01 (R)</b>	TGGTT <b>GAT</b> AGCAA	TTGAG <b>TGT</b> TATGC	CGAAAG <b>GCA</b> ATGT	

Figura 2. Sequências parciais do gene codificador da enzima ACCase ilustrando ausência de mutações conhecidas entre os biótipos estudados.

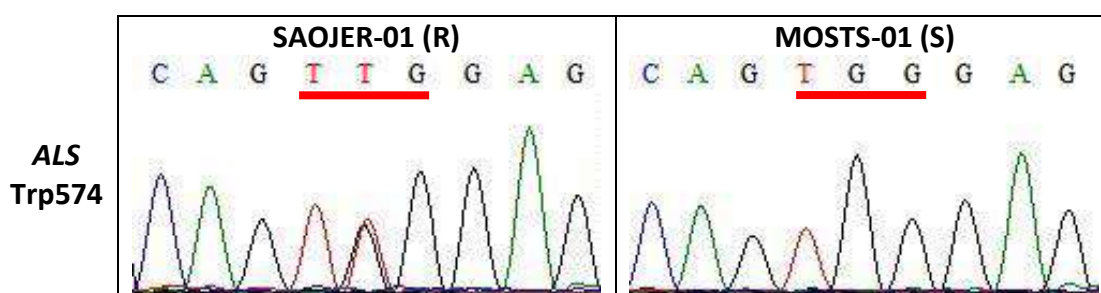


Figura 3. Sequência parcial do gene codificador da enzima ALS ilustrando mutação Trp574Leu no biótipo resistente (SAOJER-01).

## CONCLUSÃO

O biótipo SAOJER-01 apresenta resistência múltipla aos herbicidas cyhalofop-butyl e imazethapyr. A resistência ao herbicida cyhalofop-butyl é devido à metabolização conferida por enzimas P450 e GST, e não foi encontrada mutação no gene codificador da enzima ACCase. Para o imazethapyr foi encontrada a mutação Trp574Leu, porém não se pode descartar a atuação de enzimas de metabolização.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CUTTI, L. et al. Protetor isoxadifen-ethyl como responsável pela resistência de capim-arroz ao herbicida fenoxaprop-p-ethyl. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, XXXI, 2018, Rio de Janeiro, **Anais...** Londrina: SBCPD, 2018. p.612. E-book.
- EBERHARDT, D.S. et al. Barnyardgrass with Multiple Resistance to Synthetic Auxin, ALS and ACCase Inhibitors. **Planta Daninha**, v.34, n.4, p.823-832, 2016.
- MATZENBACHER et al. Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone and quinclorac herbicides. **Journal of Agricultural Science**, v.153, n.6, p.1044-1058, 2014.
- RUIZ-SANTAELLA, J.P. et al. Resistance mechanisms to cyhalofop-butyl in a biotype of *Echinochloa phyllopogon* (Stapf) Koss. from California. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.20, p.95-100, 2006.
- WRIGTH, A.A. et al. Characterization of Fenoxaprop-P-Ethyl-Resistant Junglerice (*Echinochloa colona*) from Mississippi. **Weed Science**, v.64, n.4, p.588-595, 2016.