

# **Disciplina LPV 5730**

# **Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas**

**Prof. Dr. Pedro Jacob Christoffoleti**  
**ESALQ – USP**

**Aula: Resistência aos herbicidas  
inibidores da ALS**



# Evolução da resistência ao herbicidas inibidores da ALS

## Objetivos da aula

- ▶ Entender os mecanismos de resistência
- ▶ Custos associados com a resistência
- ▶ Como ocorre a evolução



# Histórico dos herbicidas inibidores da ALS começou com as Sulfoniluréias

- ✓ A descoberta das sulfoniluréias ALS foi um marco histórico na Ciência das Plantas Daninhas nos anos 80.
- ✓ 1982 – introdução do chlorsulfuron (SU)
  - ✓ Baixas doses – 1 a 2 g/ha – folhas largas em cereais
- ✓ Outras características marcantes destes herbicidas:
  - ✓ Amplo espectro de controle de plantas daninhas
  - ✓ Atividade residual no solo
  - ✓ “Janela” de aplicação maior
  - ✓ Maiores margens de seletividade para as culturas
  - ✓ Baixa toxicidade a mamíferos

# Biosynthesis of Branched Chain Amino Acids: From Test Tube to Field

Bijay K. Singh<sup>1</sup> and Dale L. Shaner

American Cyanamid Company, P.O. Box 400, Princeton, New Jersey 08543-0400

SU e IMI

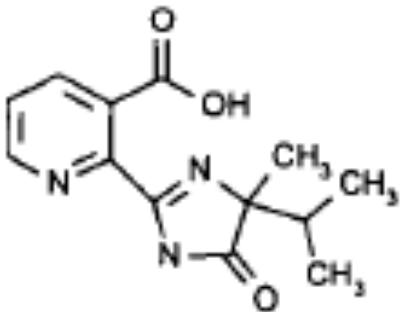
The introduction of these two classes of herbicides initiated a new era in agricultural practices worldwide due to their unique mode of action, coupled with their low mammalian toxicity and high potency. The discovery and development of these herbicides and of crops resistant to them have led to an explosion in the scientific literature on biochemical, molecular, and genetic aspects of branched chain amino acid biosynthesis.



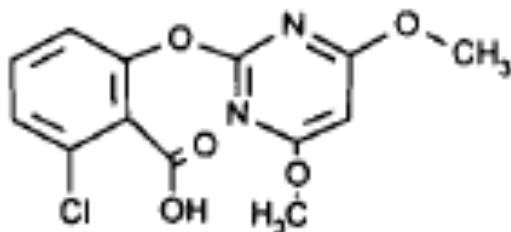
# Histórico da evolução dos herbicidas inibidores da ALS

- ✓ Outras classes químicas, além das sulfoniluréas, inibidores da ALS foram descobertas:
  - ✓ Imidazolinonas (IMIs – 1984)
  - ✓ Triazolopirimidinas sulfoanilidas (TPs – 1990)
  - ✓ Pirimidiloxitiobenzoatos (PTBs – 1990)
  - ✓ Outras classes químicas sob investigação
- ✓ Atualmente, inúmeras marcas comerciais com imensa variação de espectro de controle, desde gramíneas a folhas largas; desde anuais a perenes
- ✓ Comercializado em quase todas as áreas agricultáveis do mundo
- ✓ Os inibidores da ALS influenciaram de forma significativa os rumos da Ciência das Plantas Daninhas

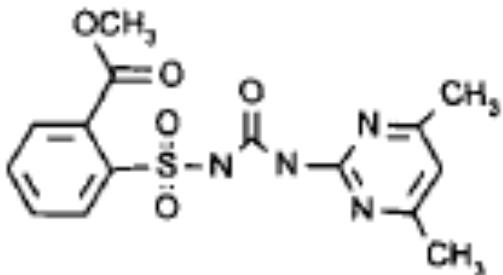
- IMI (6) Imazethapyr
- TP (7) Penoxsulam
- PTB (6) Bispyrbac-sodium
- SCT (3) Thifencarbazone-methyl



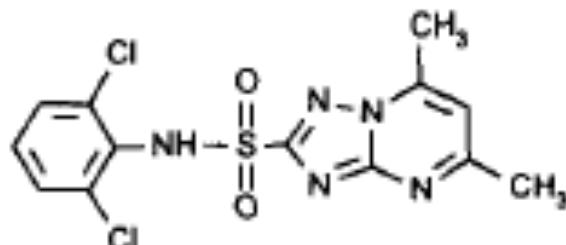
IMIDAZOLINONE



PYRIMIDYL-OXY-BENZOIC ACID



SULFONYLUREA



TRIAZOLOPYRIMIDINE SULFONAMIDE

# Herbicidas INIBIDORES DA ALS

## Classificação HRAC – Grupo B

### Sulfoniluréias:

- ✓ chlorimuron-ethyl
- ✓ metsulfuron-methyl
- ✓ nicosulfuron

### Imidazolinonas:

- ✓ Imazethapyr
- ✓ Imazapic
- ✓ imazaquin
- ✓ Imazapyr

### Triazolopirimidina:

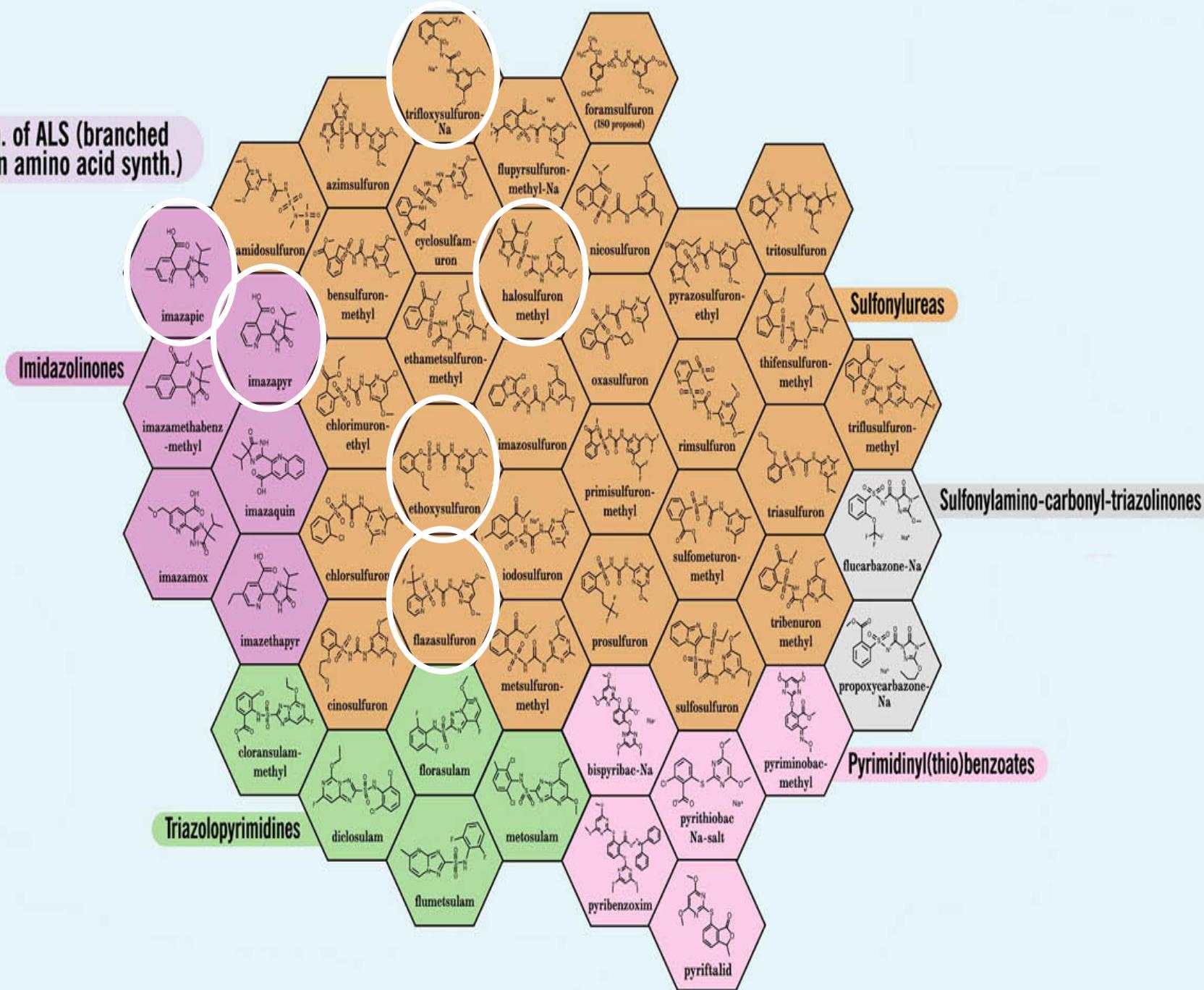
- ✓ flumetsulan
- ✓ diclosulan

### Pirimidiloxibenzoatos:

- ✓ pyriproxyfen
- ✓ bispyribac-sodium

**B**

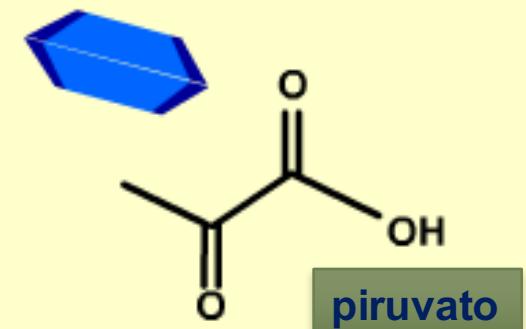
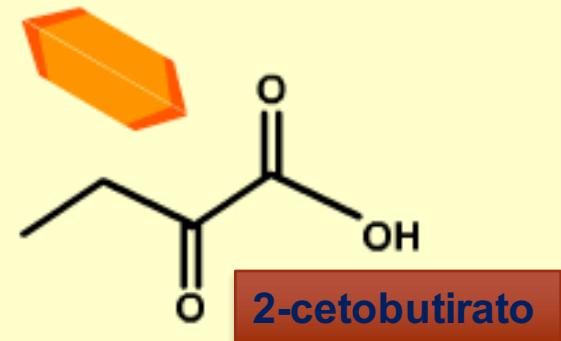
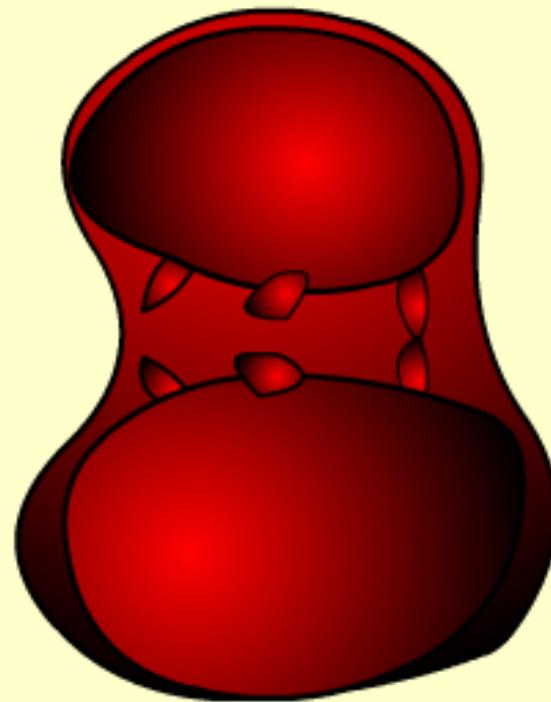
## Inh. of ALS (branched chain amino acid synth.)

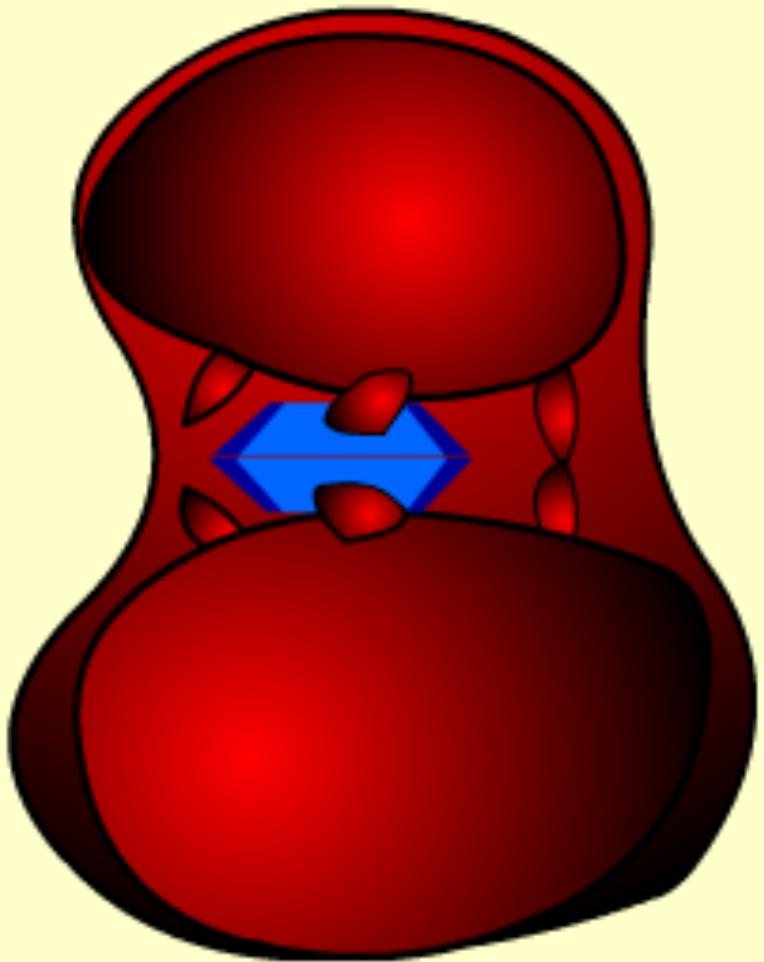


# Mecanismo de ação

- ✓ Inibidores da ALS é um grupo de herbicidas dos mais usados, no entanto, é notória a habilidade deste herbicidas em selecionar populações resistentes (R) de plantas daninhas.

ALS (acetolactato sintase)



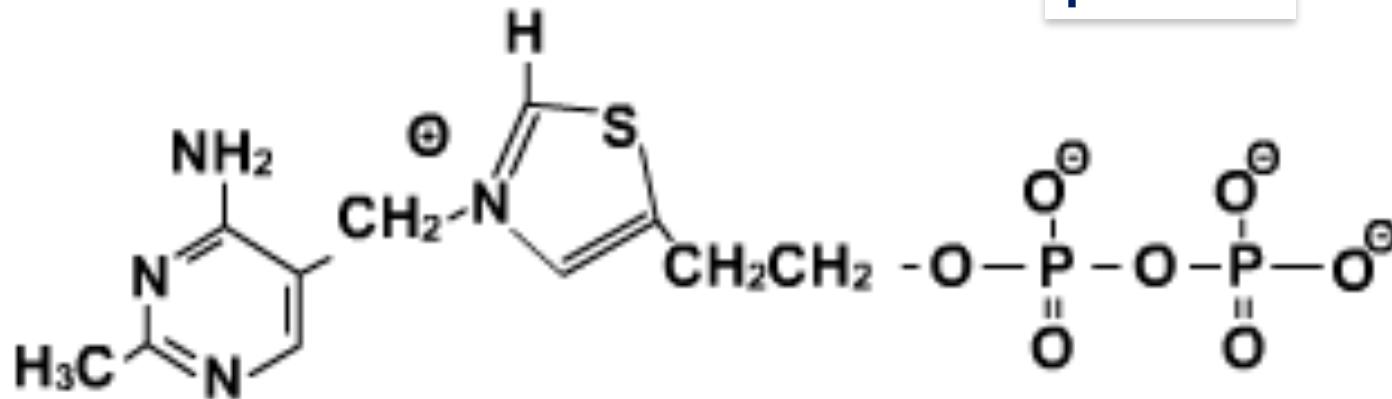


Hidroxi-etil-tiamina pirofosfato  
(HTTP)

## Formação do HTTP

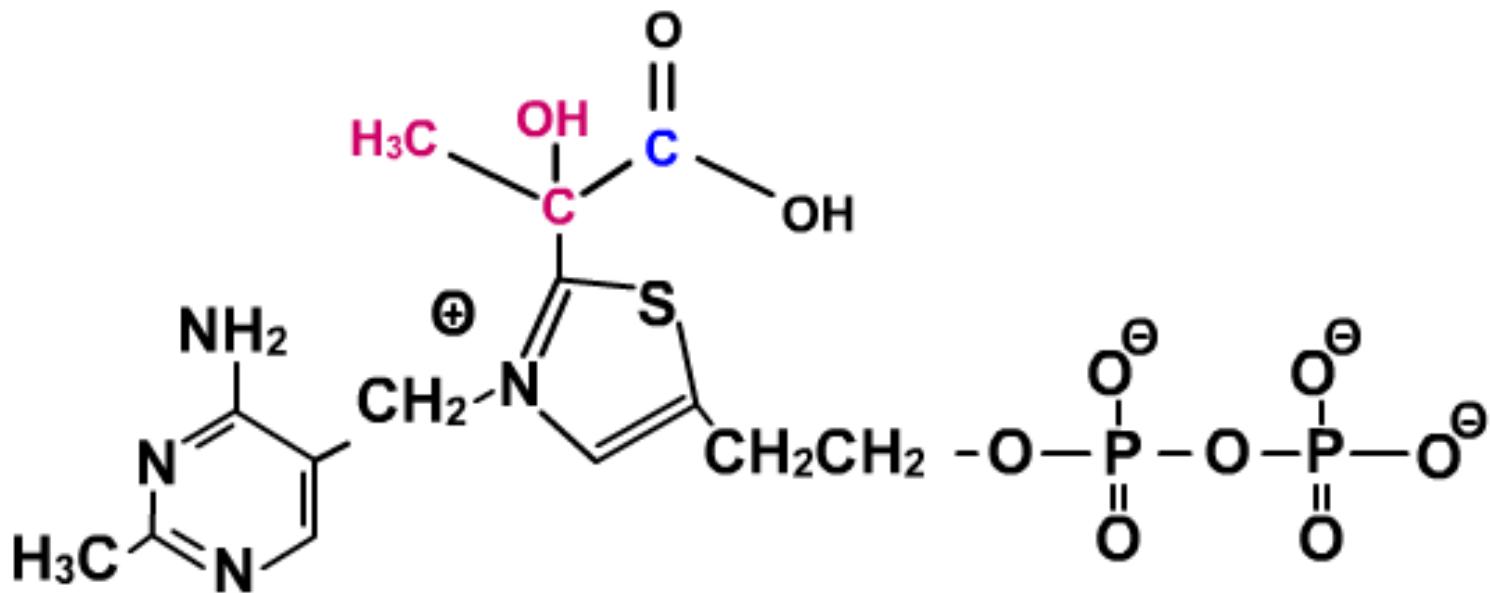


piruvato

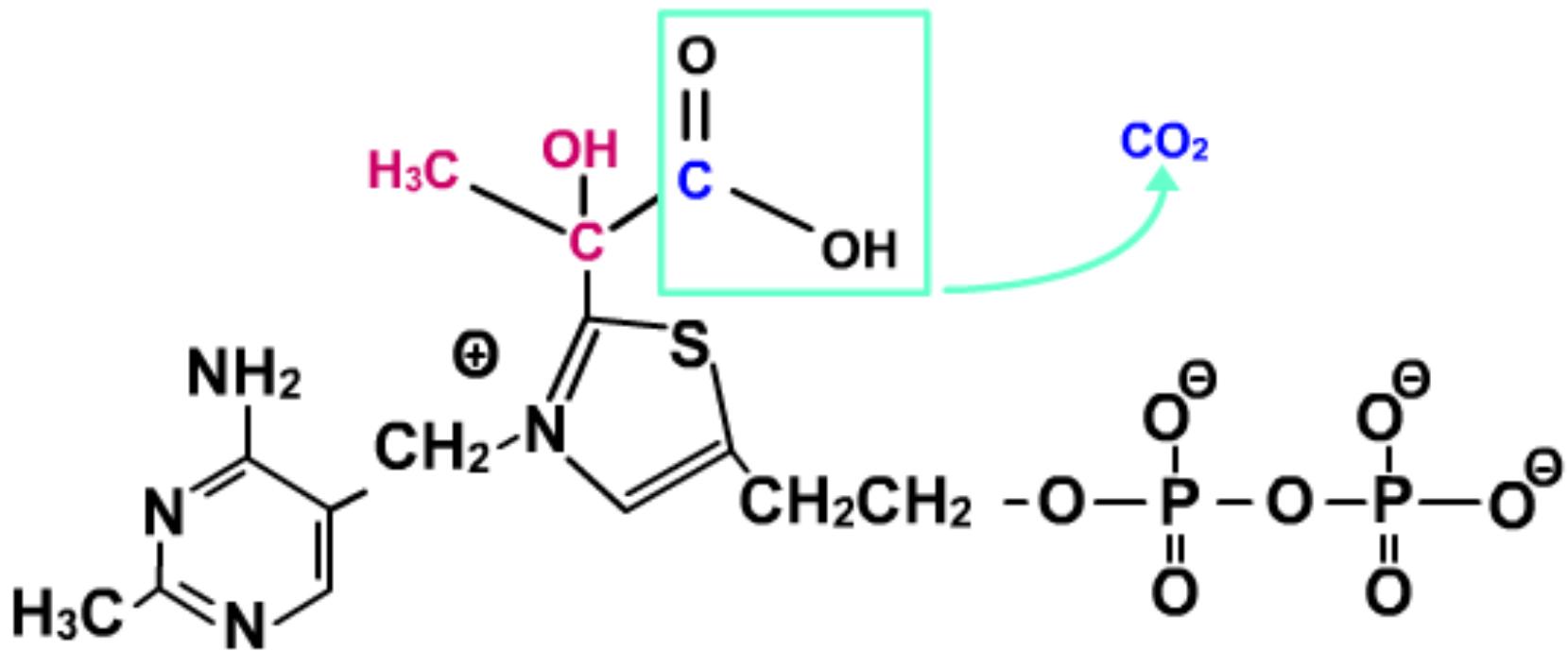


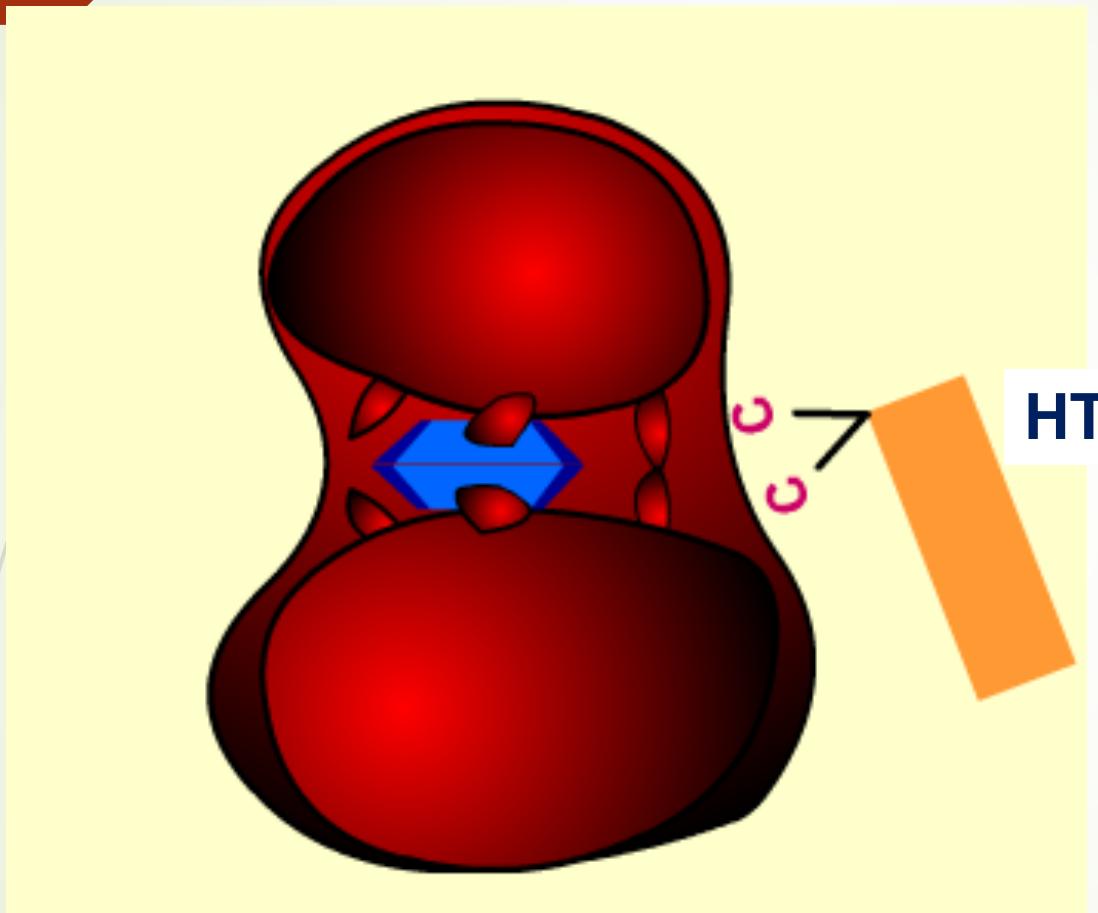
TTP

## Formação do HTTP

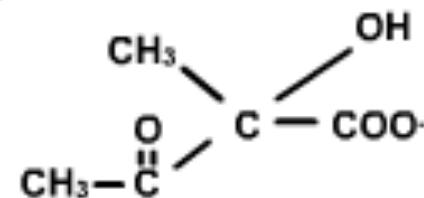
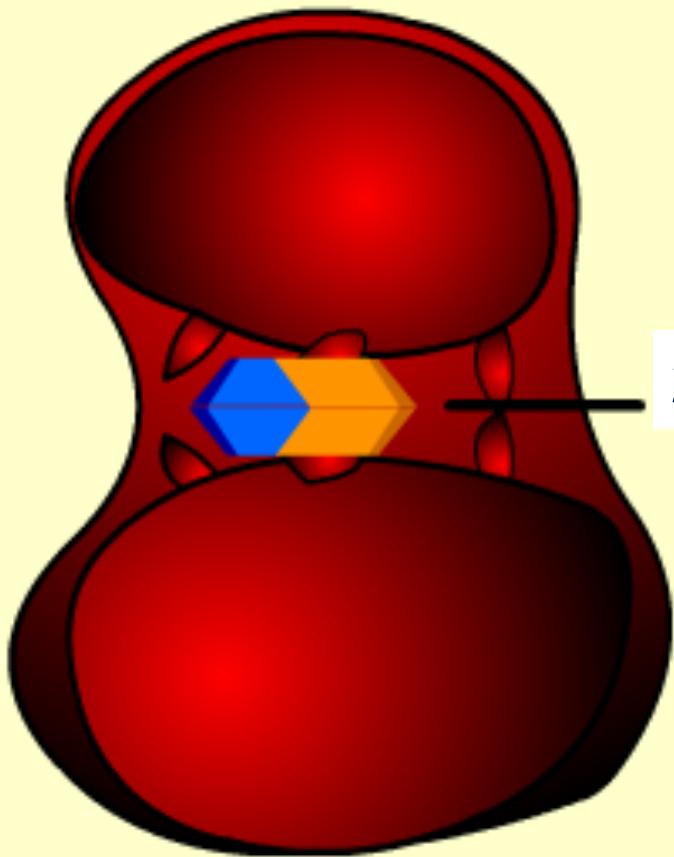


# Formação do HTTP





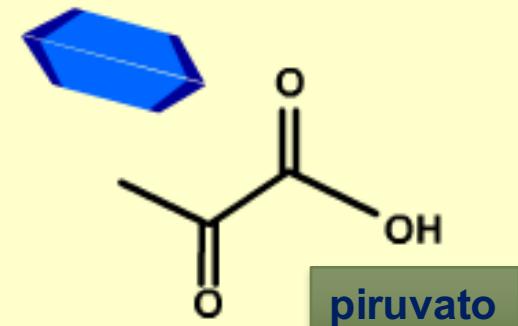
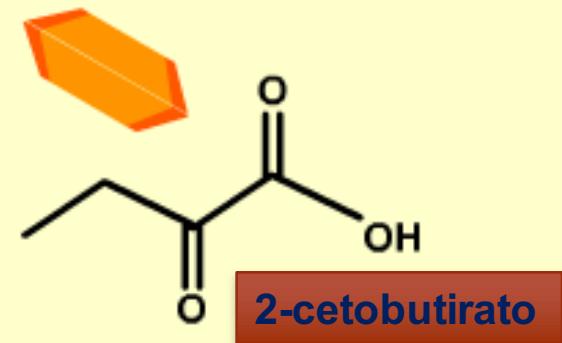
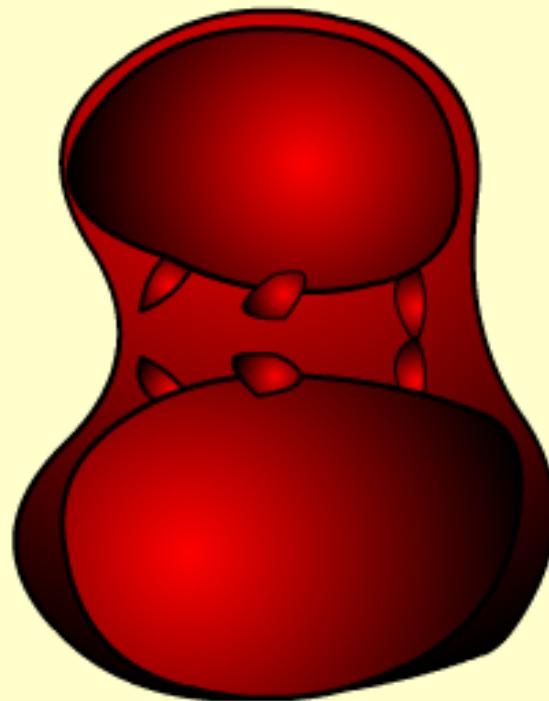
HTTP

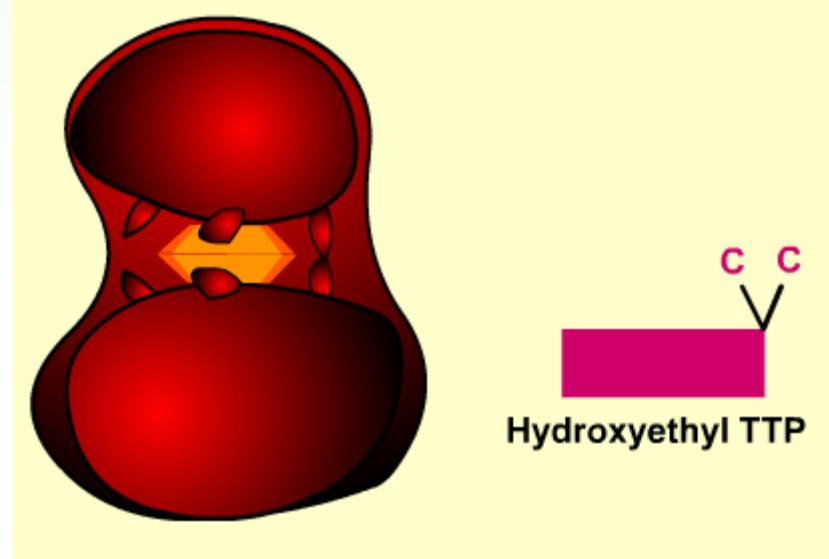
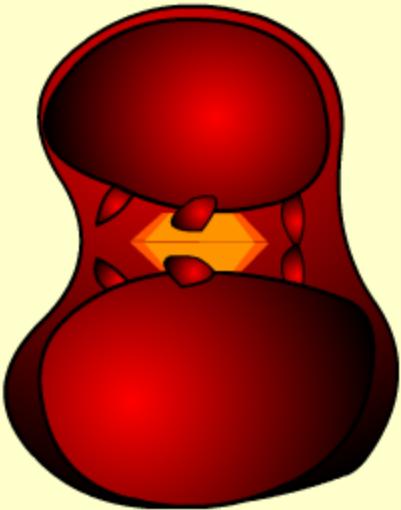


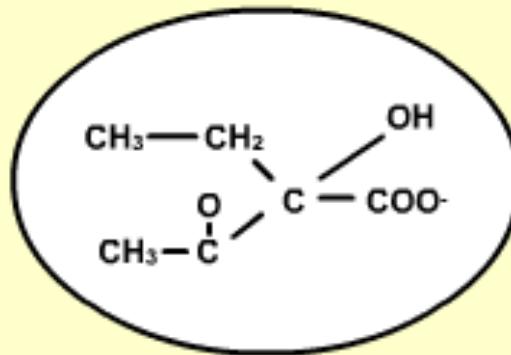
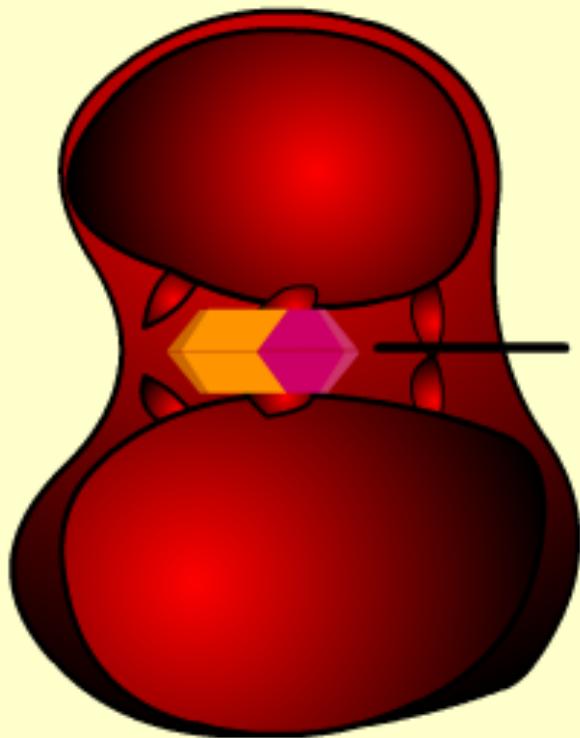
**2-acetolactato (ALS)**

Quando o processo é repetido começa agora com o 2-cetobutirato e um segundo produto é formado

ALS (acetolactato sintase)

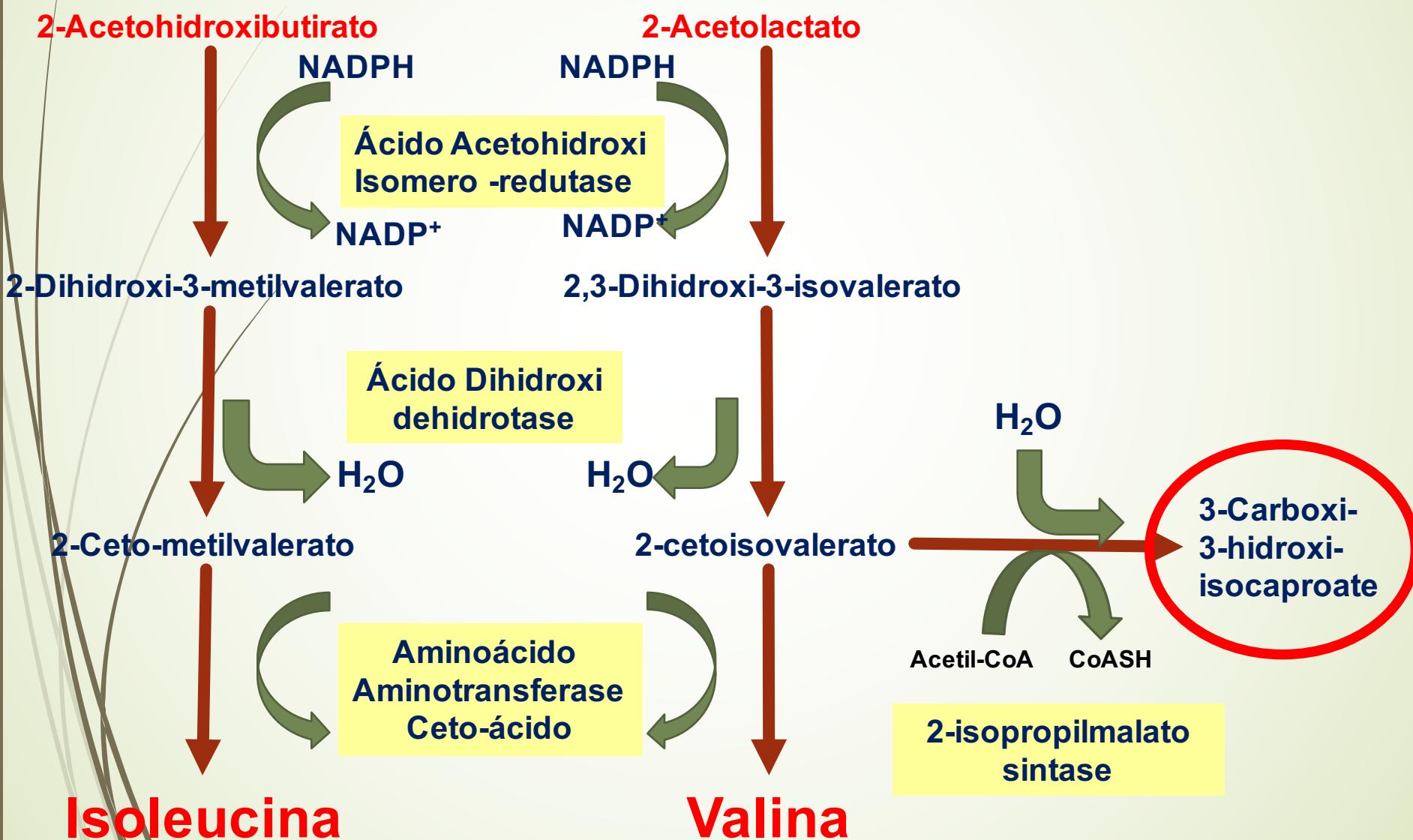


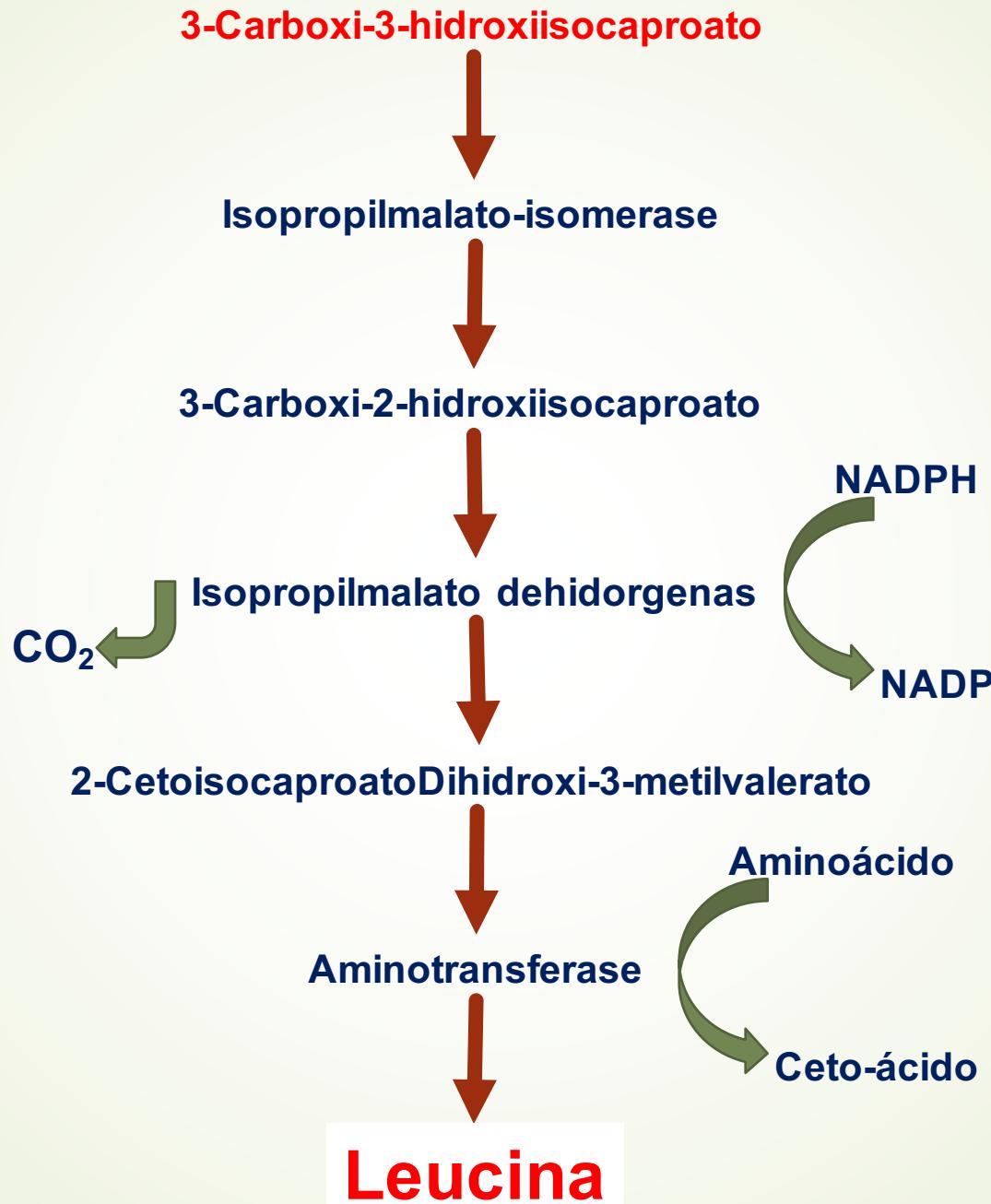




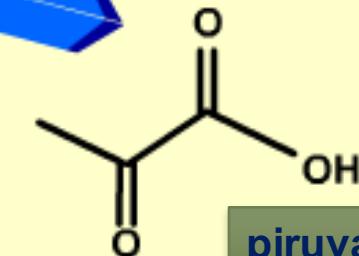
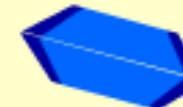
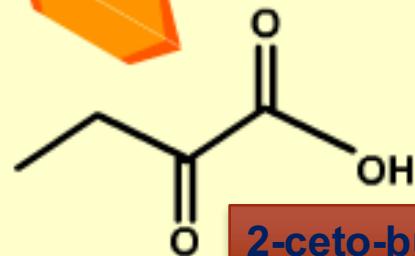
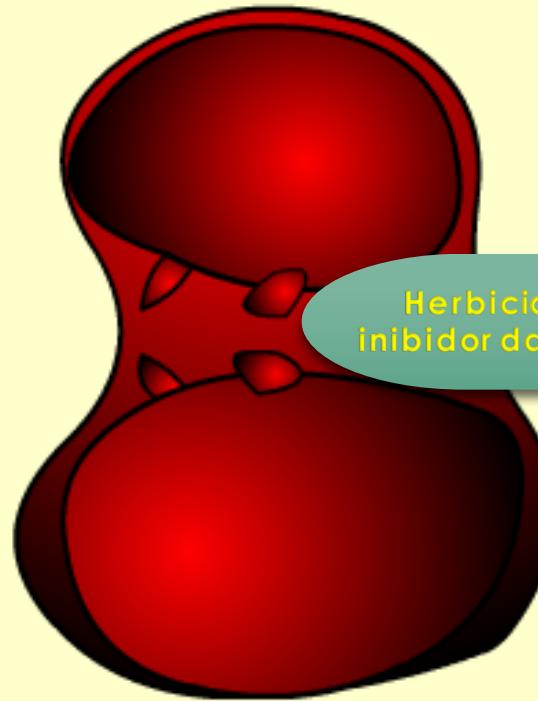
2-acetohydroxybutyrate

# Via de síntese dos aminoácidos alifáticos de cadeia lateral depois da produção da ALS





## Resistência aos herbicidas inibidores da ALS



# Características dos inibidores da ALS

- ✓ **Sintomas:**
  - ✓ Interrupção da divisão celular e paralização do crescimento
  - ✓ Clorose e necrose dos meristemas apicais e morte ( 7 a 14 dias)
- ✓ **Seletividade por metabolismo**
- ✓ **Persistência de moderada a longa no solo**
- ✓ **Aplicação solo e foliar (pré ou pós-emergência)**
- ✓ **Translocação xilema e floema**
- ✓ **Controle de folhas largas (princ.), estreitas e ciperáceas**
- ✓ **Baixa toxicidade**
- ✓ **Ativo em pequenas doses**
- ✓ **Baixa volatilização e fotólise**

## Sintomas dos inibidores da ALS



No entanto, o “Calcanhar de Aquiles” destes herbicidas:



A propensão em selecionar facilmente populações resistentes (R) de plantas daninhas.

# Resistência de plantas daninhas aos inibidores das ALS

- ✓ 1987 – 5 anos após a introdução do chlorsulfuron
- ✓ Atualmente – 129 biótipos R registrados
- ✓ Predominantemente a resistência é resultado de reduzida sensibilidade da enzima sítio de ação – ALS
- ✓ Eventualmente ocorre resistência metabólica, porém de baixa magnitude (<10x) e resulta em resistência múltipla:
  - ✓ *Lolium multiflorum*
  - ✓ *Alopecurus myosuroides*
- ✓ Razões da alta frequência de seleção de populações resistentes:
  - ✓ Uso repetitivo do herbicida em áreas extensivas no passado
  - ✓ Pouco uso de herbicidas alternativos em associação
  - ✓ Alta eficácia nos indivíduos suscetíveis nas doses utilizadas
  - ✓ Efeito residual no solo prolongado de alguns herbicidas
- ✓ **Porém, estas características ocorrem em muitos outros herbicidas também**

*Lolium rigidum*, Western Australia, 98% R pops  
(Owen et al. 2013, poster)



*Raphanus raphanistrum*, WA, 84% R pops  
(Owen et al. 2013, poster)



*Kochia scoparia*, Western Canada: 90% R pops  
(Beckie et al. 2011)



Courtesy, Hugh Beckie

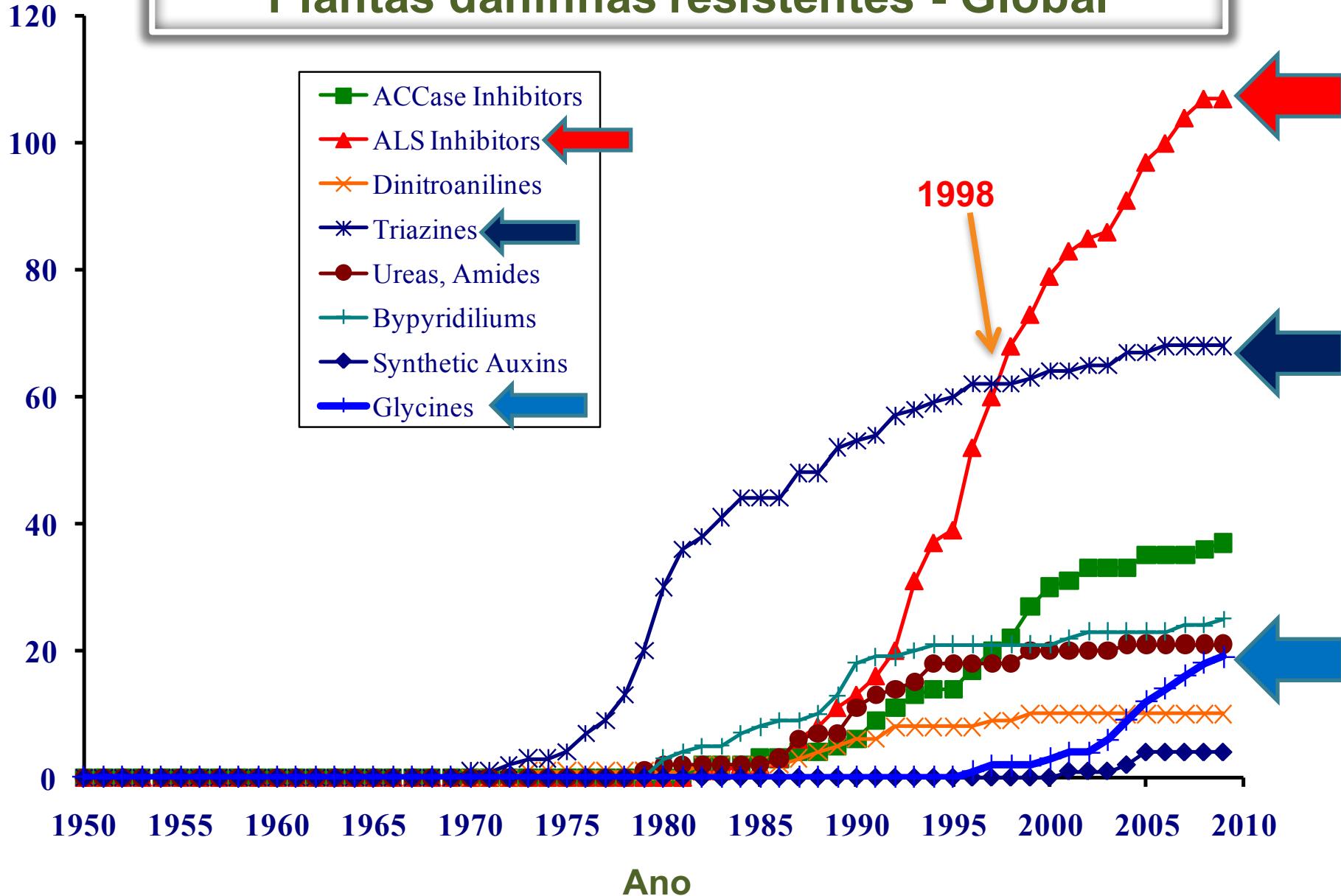


*Amaranthus tuberculatus*, Illinois: >50% R pops  
(Tranel et al. 2011)



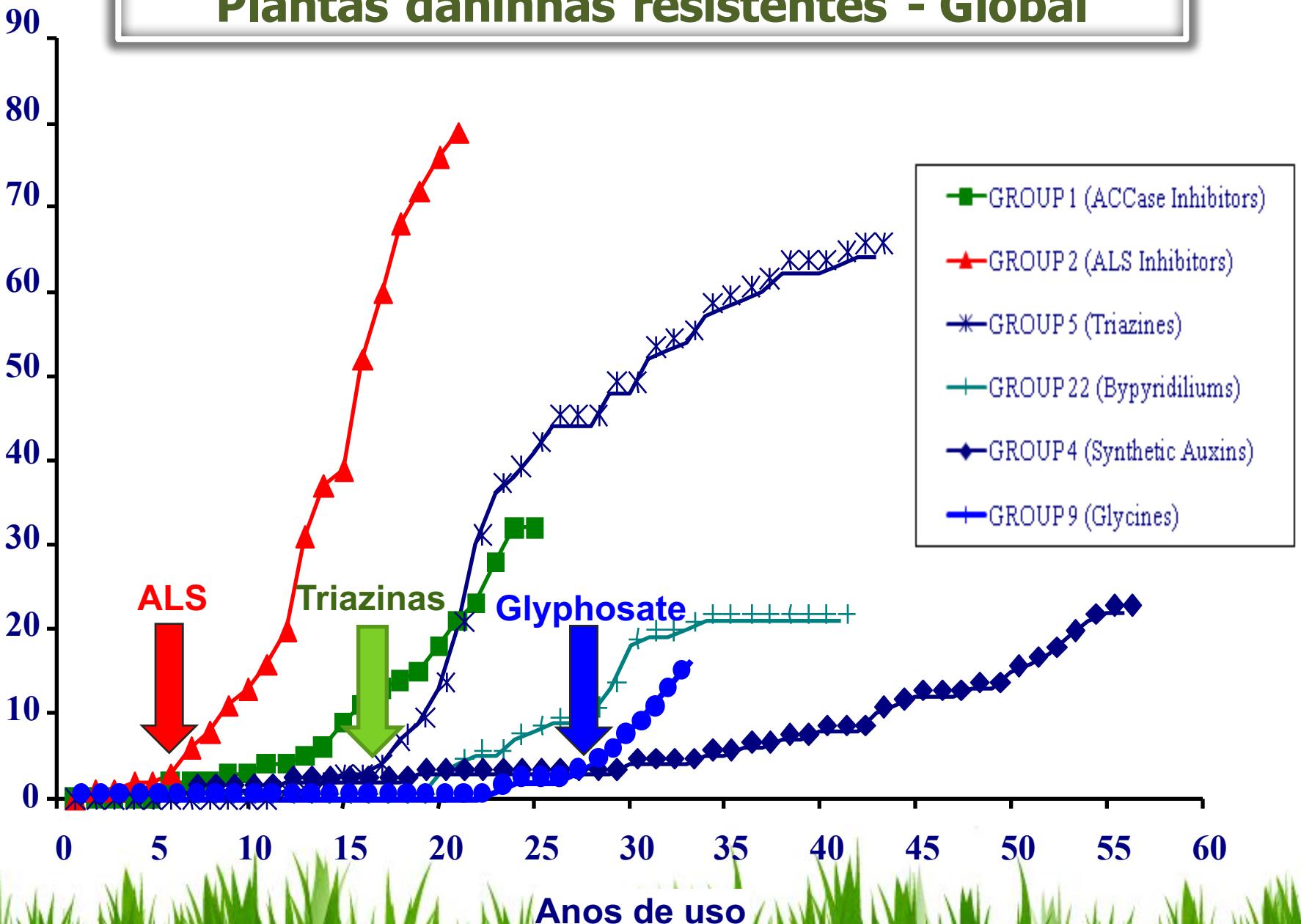
# Plantas daninhas resistentes - Global

Número de biótipos resistentes



# Plantas daninhas resistentes - Global

Número de espécies resistentes



# **Resistance mechanisms**

**target site based**

**mutation**

**over production**

**non-target site based**

**uptake**

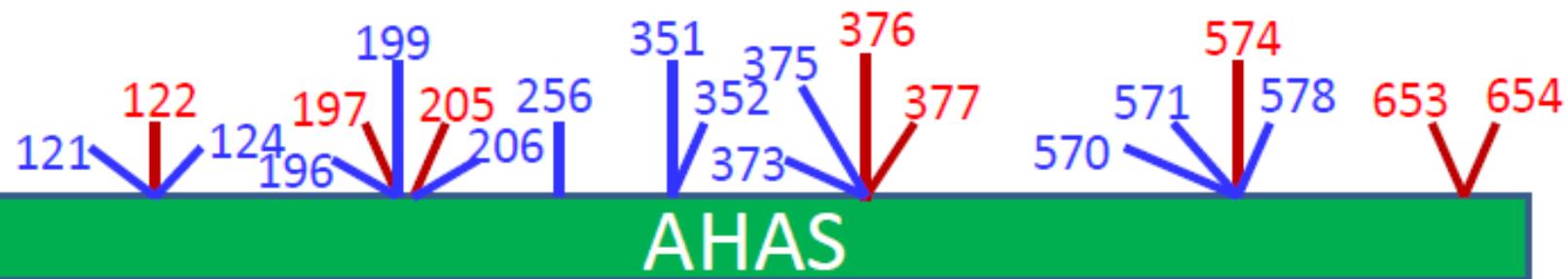
**translocation**

**metabolism**

**other**

## Mutações no sítio de ação dos herbicidas inibidores da ALS

- ✓ Foi primeiro identificado em *Kochia scoparia* e *Lactuca serriola*
- ✓ Agora 26 substituições de aminoácidos conhecidas, em 8 regiões conservadas



Será que existem novas mutações?

## Genética e Biologia Molecular da Resistência a ALS

### Alelo R:

- ✓ Monogênico, dominante sobre o alelo S, e embora a ALS atua no cloroplasto o gene é nuclear e segue a herança Mendeliana
- ✓ Disseminado tanto pelo polén quanto pela semente
- ✓ Explica a alta frequência natural da resistência

### Variabilidade natural do ALS:

- ✓ A variabilidade genética é o “combustível” em que a seleção age, sendo esta normalmente mutações espontâneas
- ✓ Tipicamente a taxa de mutação de uma par de bases (alelo) é de  $1/10^8$  a  $1/10^{10}$ , porém ninguém conhece a taxa real de mutação do gene da ALS
- ✓ Taxa varia por espécie de planta daninha
  - ✓ Exemplo de *Xanthium strumarium* x *Ambrosia Arttemisiifolia*
- ✓ No entanto, nem sempre polimorfismo genético resulta em polimorfismo nas proteínas codificadas

## Mutações nos sítios de ação da ALS

Algumas mutações são mais comuns que outras

- ✓ Mutações na Pro-197 e no Trp-574-Leu são mais frequente, refletindo nos padrões de uso e pressão de seleção (SU, SU+IMI)
- ✓ A frequência de mutações requerendo somente uma mudança no nucleotídeo é maior que aquelas que requerem duas mudanças no nucleotídeo
  - ✓ Pro-197-Ser: > 20 espécies de plantas daninhas
  - ✓ Pro-197-Asn/Ile/Met/Lys/Trp: uma

## Mutações nos sítios de ação da ALS

- ✓ Os padrões de resistência cruzada ocorre de acordo com a posição de mutação na ALS

	SU	IMI
122	S	R
197	R	S
574	R	R

**Table 1.** ALS amino acid substitutions that confer herbicide resistance and that were identified in herbicide resistant weed populations. Resistance-conferring ALS mutations that were intentionally selected (i.e., laboratory selections) are not included in this table.

Amino Acid Residue and Number <sup>(1)</sup>	Substitution conferring resistance	Weed Species	SU <sup>(2)</sup>	IMI <sup>(2)</sup>	PTB <sup>(2)</sup>	TP <sup>(2)</sup>	SCT <sup>(2)</sup>	Year <sup>(3)</sup>
Ala 122	Thr	Xanthium strumarium	S	R	S	ND	ND	1995
	Thr	Amaranthus hybridus	S	R	S	S	ND	1998
	Thr	Solanum ptycanthum	S	R	ND	ND	ND	2000
	Thr	Amaranthus retroflexus	ND	R	ND	ND	ND	2005
	Thr	Amaranthus powellii	S	R	ND	ND	ND	2005
Pro 197	His	Lactuca serriola	R	r	S	r	ND	1992
	Thr	Kochia scoparia	R	S	ND	R	ND	1992
	Arg	Kochia scoparia	R	ND	ND	ND	ND	1995
	Leu	Kochia scoparia	R	ND	ND	ND	ND	1995
	Gln	Kochia scoparia	R	ND	ND	ND	ND	1995
	Ser	Kochia scoparia	R	ND	ND	ND	ND	1995
	Ala	Kochia scoparia	R	ND	ND	ND	ND	1995
	Ala	Brassica tournefortii	R	S	ND	R	ND	1999
	Ile	Sisymbrium orientale	R	r	ND	R	ND	1999
	Leu	Amaranthus retroflexus	R	R	R	R	ND	2001
	Ala	Raphanus raphanistrum	R	S	ND	R	ND	2002

Amino Acid Residue and Number <sup>(1)</sup>	Substitution conferring resistance	Weed Species	SU <sup>(2)</sup>	IMI <sup>(2)</sup>	PTB <sup>(2)</sup>	TP <sup>(2)</sup>	SCT <sup>(2)</sup>	Year <sup>(3)</sup>
Pro 197	Thr	<i>Raphanus raphanistrum</i>	R	S	ND	R	ND	2002
	Ala	<i>Lindernia dubia</i>	R	ND	ND	ND	ND	2002
	Ser	<i>Lindernia dubia</i> var. major	R	ND	ND	ND	ND	2002
	Gln	<i>Lindernia micrantha</i>	R	ND	ND	ND	ND	2002
	Ser	<i>Lindernia micrantha</i>	R	ND	ND	ND	ND	2002
	Gln	<i>Lindernia procumbens</i>	R	ND	ND	ND	ND	2002
	Ser	<i>Lindernia procumbens</i>	R	ND	ND	ND	ND	2002
	Ser	<i>Amaranthus blitoides</i>	R	S	r	r	ND	2003
	His	<i>Raphanus raphanistrum</i>	R	S	ND	R	ND	2003
	Ser	<i>Raphanus raphanistrum</i>	R	S	ND	R	ND	2003
	Thr	<i>Chrysanthemum coronarium</i>	R	r	R	r	R	2004
	Ser	<i>Chrysanthemum coronarium</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2004
	Ser	<i>Monochoria vaginalis</i>	R	ND	ND	ND	ND	2004
	Leu	<i>Helianthus annuus</i>	R	ND	ND	ND	ND	2004
	His	<i>Papaver rhoeas</i>	R	r	ND	S	ND	2004
	Thr	<i>Papaver rhoeas</i>	R	r	r	r	ND	2004
	Ser	<i>Papaver rhoeas</i>	R	r	r	r	ND	2004
	Ser	<i>Bromus tectorum</i>	R	S	ND	ND	R	2004

Amino Acid Residue and Number <sup>(1)</sup>	Substitution conferring resistance	Weed Species	SU <sup>(2)</sup>	IMI <sup>(2)</sup>	PTB <sup>(2)</sup>	TP <sup>(2)</sup>	SCT <sup>(2)</sup>	Year <sup>(3)</sup>
<b>Ala 205</b>	Val	Xanthium strumarium	r	r	r	r	ND	1996
	Val	Helianthus annuus	r	R	ND	ND	ND	2003
	Val	Amaranthus retroflexus	S	R	ND	ND	ND	2005
	Val	Solanum ptycanthum	r	R	ND	S	ND	2007
<b>Asp 376</b>	Glu	Amaranthus hybridus	R	R	R	R	R	2004
	Glu	Kochia scoparia	R	ND	ND	ND	ND	2008
	Glu	Amaranthus powellii	R	R	R	R	R	2009
<b>Arg 377</b>	His	Apera spica-venti	R	ND	ND	R	R	2011
<b>Trp 574</b>	Leu	Xanthium strumarium	R	R	R	R	ND	1995
	Leu	Amaranthus tuberculatus (syn. rudis)	R	R	ND	R	ND	1996
	Leu	Amaranthus hybridus	R	R	ND	R	ND	1997
	Leu	Kochia scoparia	R	R	ND	ND	ND	1999
	Leu	Sisymbrium orientale	R	R	ND	R	ND	1999
	Leu	Ambrosia artemisiifolia	R	R	ND	R	ND	2001
	Leu	Ambrosia trifida	R	R	ND	R	ND	2002
	Leu	Raphanus raphanistrum	ND	ND	ND	ND	ND	2002
	Leu	Amaranthus blitoides	R	R	R	R	ND	2003
	Leu	Camelina microcarpa	R	R	ND	R	R	2004

Amino Acid Residue and Number <sup>(1)</sup>	Substitution conferring resistance	Weed Species	SU <sup>(2)</sup>	IMI <sup>(2)</sup>	PTB <sup>(2)</sup>	TP <sup>(2)</sup>	SCT <sup>(2)</sup>	Year <sup>(3)</sup>
Ser 653	Thr	Amaranthus powellii	S	R	ND	ND	ND	2001
	Thr	Amaranthus retroflexus	S	R	ND	ND	ND	2001
	Asn	Amaranthus tuberculatus (syn. rudis)	S	R	ND	S	ND	2001
	Thr	Amaranthus tuberculatus (syn. rudis)	S	R	ND	S	ND	2001
	Asn	Amaranthus hybridus	r	R	R	r	ND	2006
	Ile	Setaria viridis	r	R	R	ND	r	2009
	Asn	Setaria viridis	r	R	R	ND	r	2009
	Thr	Setaria viridis	r	R	S	ND	r	2009
Gly 654	Asp	Setaria viridis	r	R	S	ND	r	2009

## NOTES

## HERBICIDE FAMILY ABBREVIATIONS

1. Amino acid number is standardized to the *Arabidopsis thaliana* sequence

SU = Sulfonylureas

2. S = Susceptible biotype

IMI = Imidazolinones

r = Moderate resistance (< 10-fold relative to sensitive biotype)

PTB = Pyrimidinylthiobenzoates

R = High Resistance (> 10-fold)

TP = Triazolopyrimidines

ND = Not Determined

SCT = Sulfonylaminocarbonyltriazolinone

It should be noted that these classifications are generalizations.

3. The year that the mutation was first reported: see details for reference.

[Editor's Logon](#)

Test.

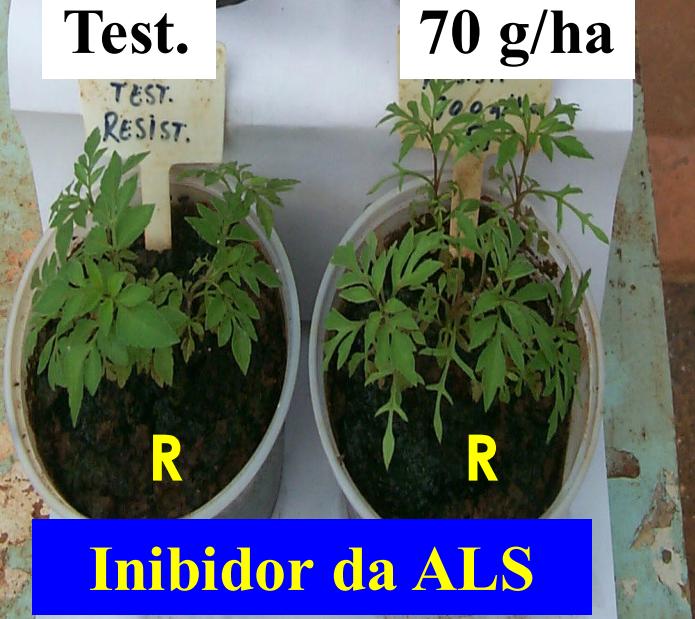
70 g/ha



**Chlorimuron (SU)**

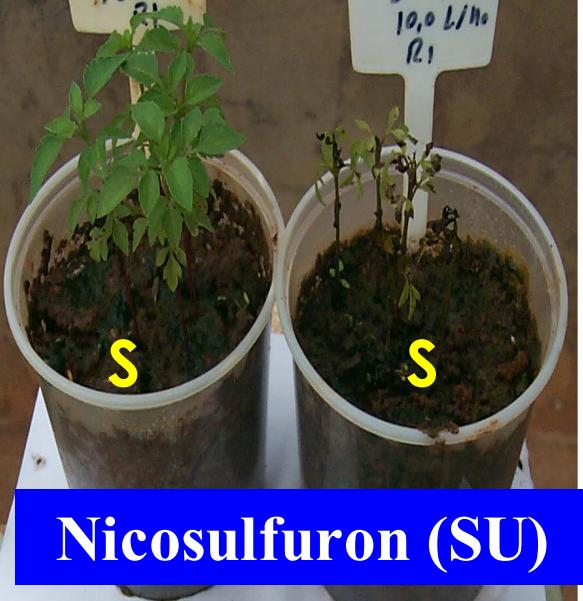
Test.

70 g/ha



Test.

100 g/ha



**Nicosulfuron (SU)**

Test.

100 g/ha



**Inibidor da ALS**

Test.

100 mL/ha



**Imazethapyr (IM)**

Test.

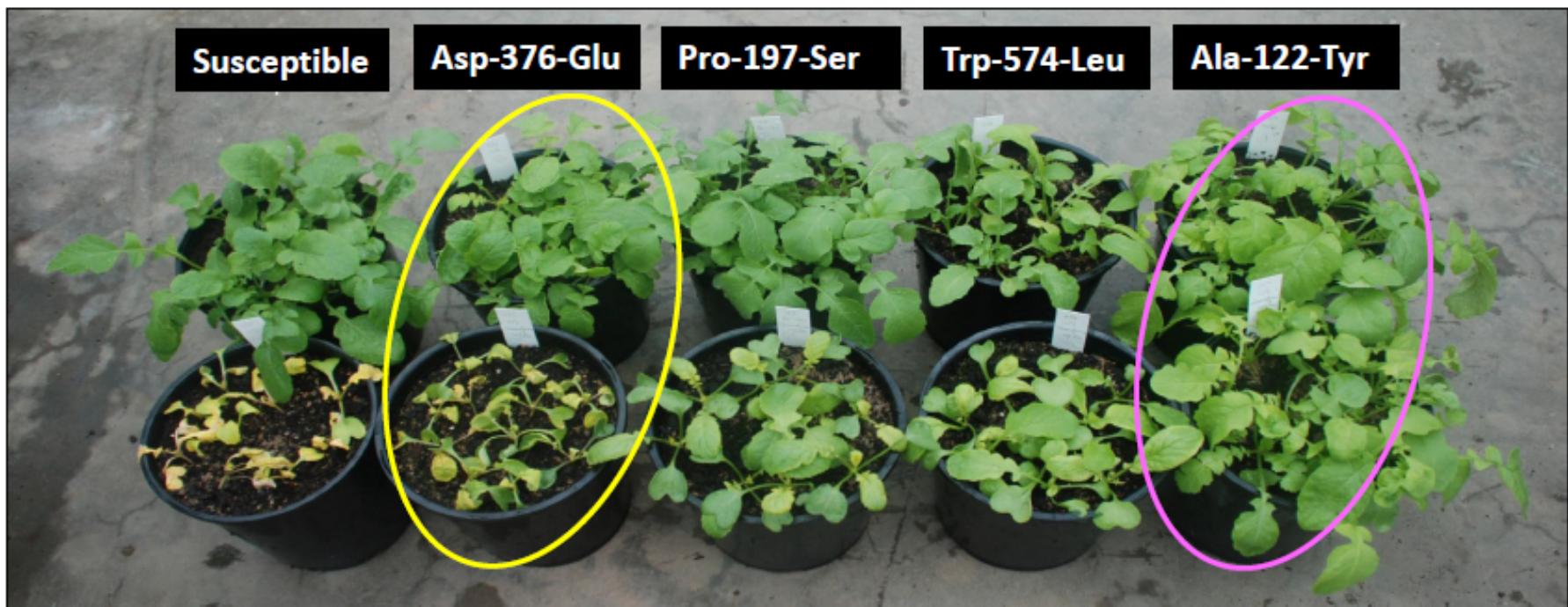
100 mL/ha



**Inibidor da ALS**

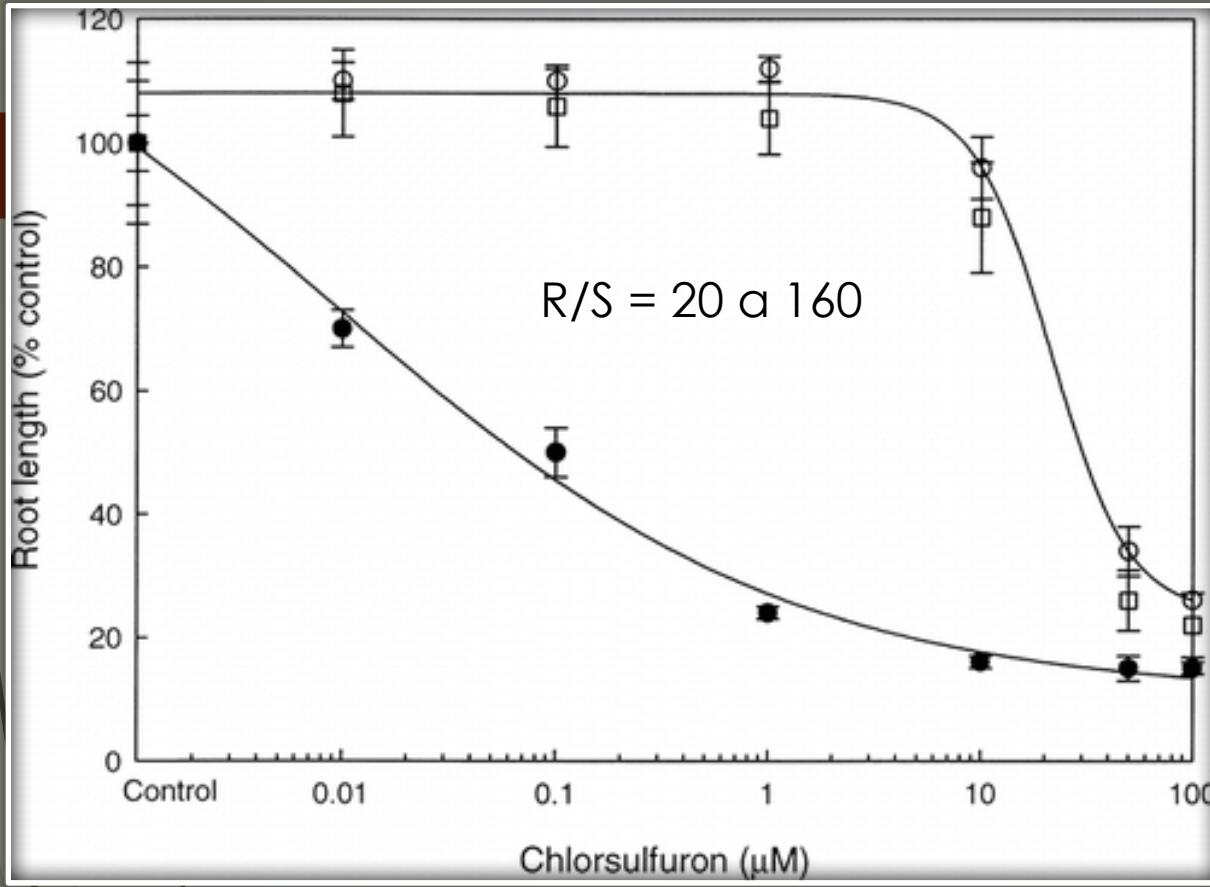
# Mutações nos sítios de ação da ALS

Algumas mutações são “fortes”, algumas são “fracas”



Chlorsulfuron (20g/ha)

(Yu et al. 2011, Han et al. 2011)



Níveis  
elevados de  
resistência

Weed Science 51(6):831-838. 2003

doi: 10.1614/02-166

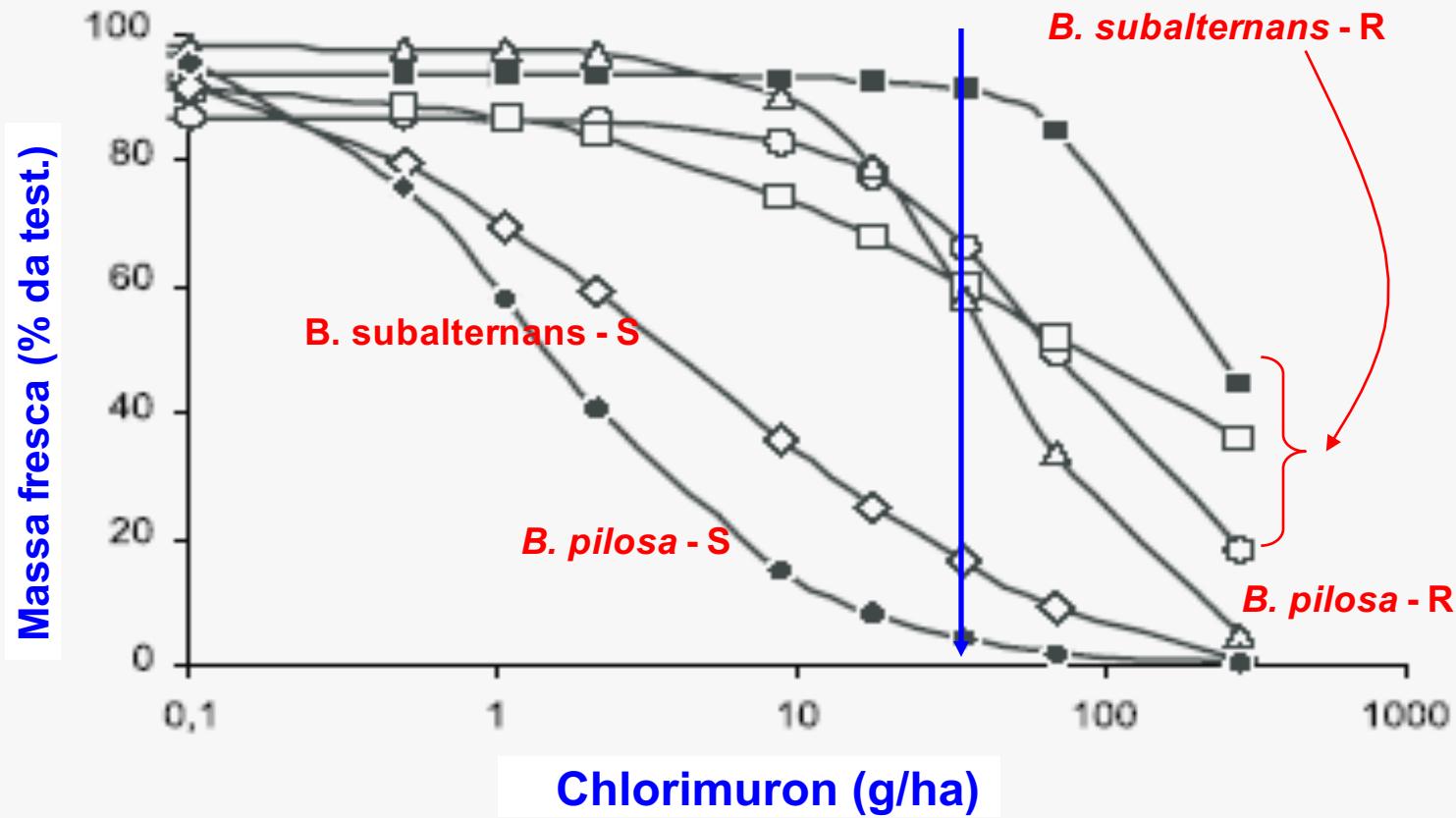
**ALS gene proline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations**

Qin Yu<sup>a</sup>, Xiao Qi Zhang<sup>a</sup>, Abul Hashem<sup>b</sup>, Michael J. Walsh<sup>c</sup>, and Stephen B. Powles<sup>d</sup>

**C<sub>50</sub> (controle de 50%) e GR<sub>50</sub> (redução de 50% da massa de plantas sem secagem) e fator de resistência (R/S) de *Bidens pilosa* e *B. subalternans***

Nº <sup>1</sup>	State	Species	chlorimuron-ethyl			imazethapyr		
			Control (C <sub>50</sub> )	Fresh Weight g i.a.	(GR <sub>50</sub> )	Control (C <sub>50</sub> )	Fresh weight (GR <sub>50</sub> )	
1	Res.	MT <i>B. subalternans</i>	258.765	68.228		48.167	13.230	
2	Res.	SP <i>B. subalternans</i>	136.309	82.906		146.664	89.225	
3	Res.	MS <i>B. subalternans</i>	229.079	240.737		--	--	
4	Res.	PR <i>B. pilosa</i>	73.989	44.178		18.022	7.733	
5	Sus.	SP <i>B. subalternans</i>	5.549	3.747		13.704	7.232	
6	Sus.	SP <i>B. pilosa</i>	3.432	1.518		9.536	6.013	
Resistance factor (R/S)								
1	Res.	MT <i>B. subalternans</i>	46.63	18.21		3.51	1.83	
2	Res.	SP <i>B. subalternans</i>	24.57	22.12		10.70	12.32	
3	Res.	MS <i>B. subalternans</i>	41.28	64.24		--	--	
4	Res.	PR <i>B. pilosa</i>	21.56	29.09		1.89	1.29	

**“A confirmação de que o biótipo suscetível de *B. subalternans* é mais tolerante aos herbicidas chlorimuron e imazethapyr revela como é importante a identificação da espécie para um controle efetivo e comprovação da resistência”**



# Mutações nos sítios de ação da ALS

As mutações podem ser nos diversos níveis de complexidade das plantas

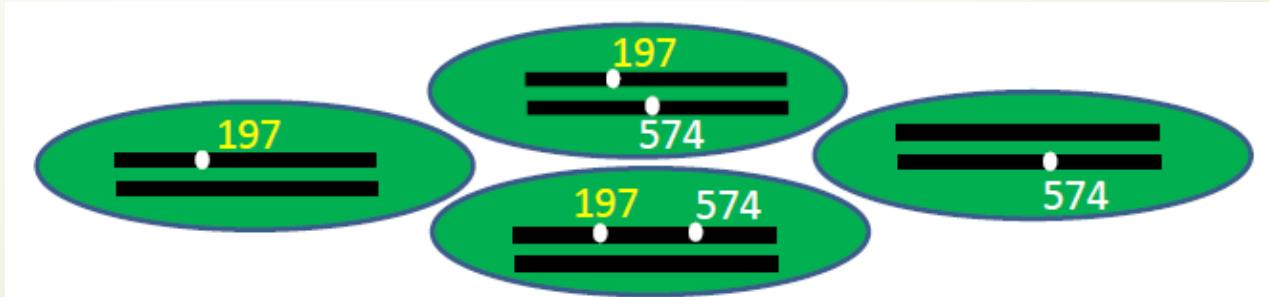
A nível de população



A nível de indivíduo



A nível de alelo



## Efeito da mutação na adaptabilidade ecológica:

- ✓ Christoffoleti et al. (1997) – não há diferença de adaptabilidade entre os biotipos
- ✓ No entanto, não são comparadas isolinhas – as diferenças podem ser causadas pelo polimorfismo genético
- ✓ Eberlein et al. (1999):
  - ✓ Sete retrocruzamentos – isolinhas 96% similares
  - ✓ Menor atividade na R que na S, sendo que a R é menos sensível a retroinibição, resultando em maior acúmulo de aa
- ✓ Outros trabalhos mostraram vantagem do R sobre o S
  - ✓ Maior acúmulo de aa proporciona germinação mais rápida do R
- ✓ Culturas R a ALS não sofrem redução nas propriedades de crescimento e produção em relação ao S

### Em síntese:

- ✓ Genética e biologia molecular:
  - ✓ Locus simples; genética semi-dominante
  - ✓ Efeitos mínimos dos alelos R na adaptabilidade ecológica
  - ✓ Um grande número de possíveis “point mutation” que confere resistência

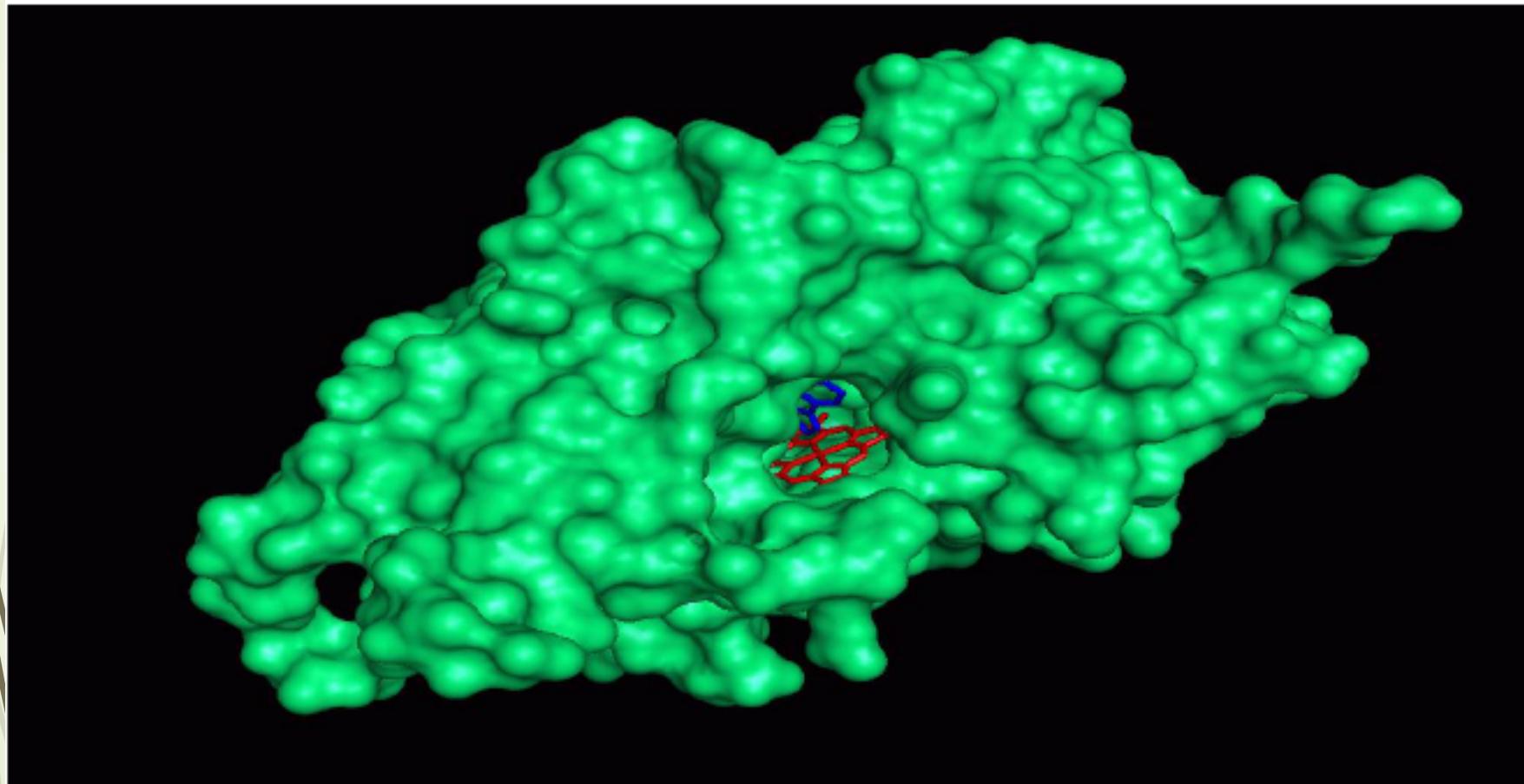
## Estrutura básica das mutações na ALS

O sítio de ligação na ALS:

- ✓ Não é no sítio ativo do herbicida
- ✓ Mas no canal de entrada do substrato na enzima
- ✓ Bloqueia o acesso para o sítio ativo

(McCourt et al. 2006; Duggleby et al. 2008)

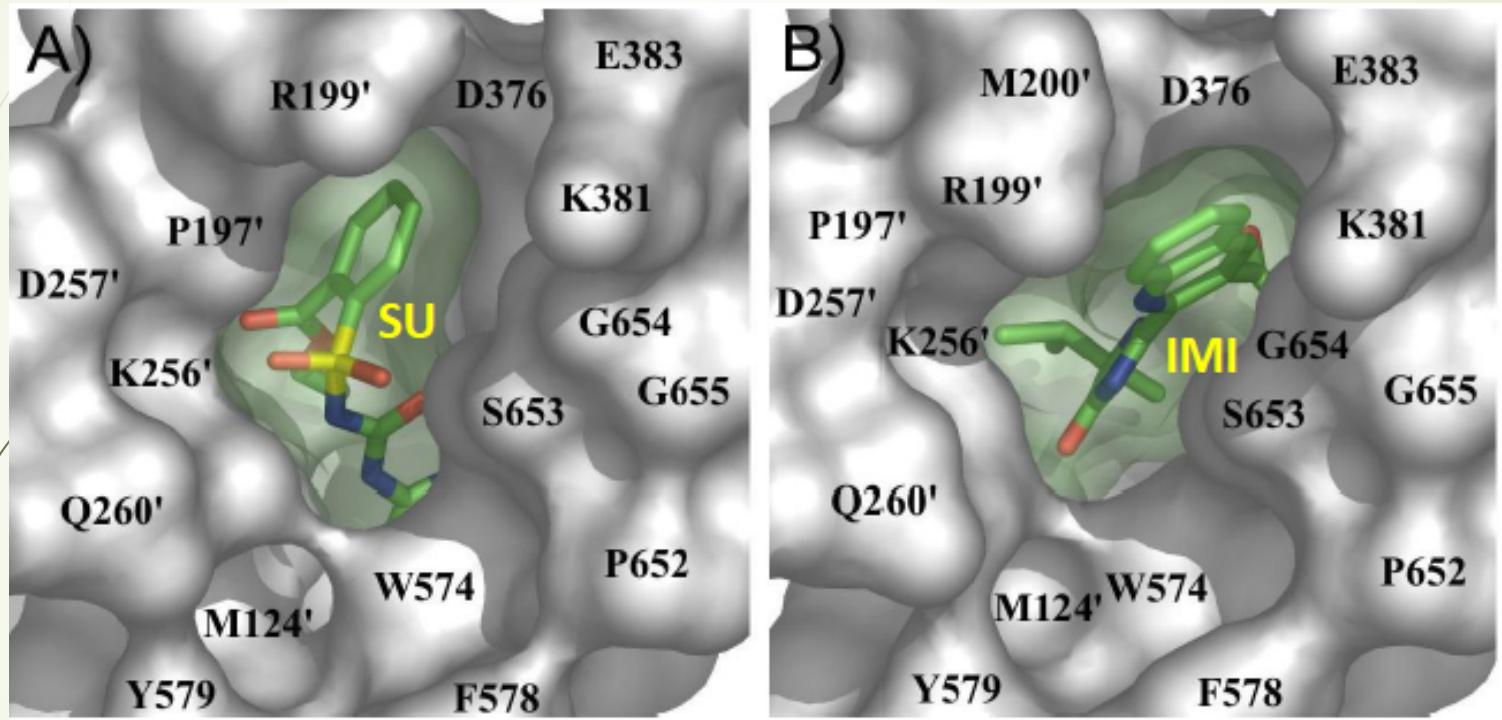
## Ligaçāo do herbicida no canal de entrada da enzima



Please note this is NOT a real model of AHAS!

Courtesy Fran Lopez Ruiz

## Estrutura básica das mutações na ALS



- ✓ Os sítios de ligação das SU e IMI são coincidentes mas não idênticos
- ✓ 18 resíduos de aa estão envolvidos na ligação do herbicida no sítio de ação

## Estrutura básica das mutações na ALS

- ✓ Mutações altamente resistente e eficiente cataliticamente (por exemplo a 574, 122) (em contraste com a mutação da EPSPS 106)
- ✓ Não existe custo adaptativo
- ✓ Padrões diferenciados de resistência cruzada
- ✓ É possível predizer e validar as mutações que conferem resistência através de modelagem (mas é especulativo devido a mudanças estruturais no sítio de ligação do herbicida)

# Mutações de resistência a ALS em poliploides

## Espécies de plantas daninhas poliploides (alotetra- e alohexa-poliploides)

*Avena fatua*

*Bidens subalternans*

*Cyperus difformis*

*Echinochloa spp*

*Lindernia spp*

*Monochoria vaginalis*

*Poa annua*

*Polygonum convolvulus*

*Salsola tragus*

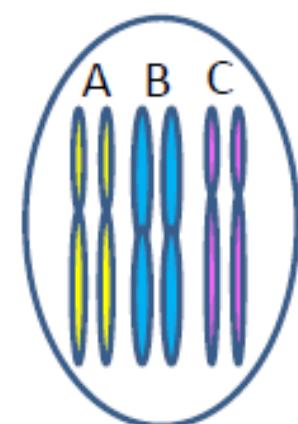
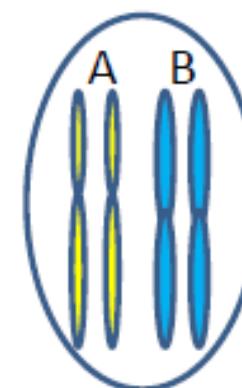
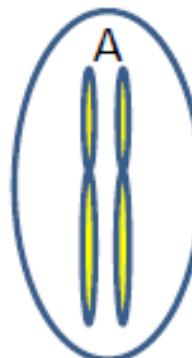
*Schenoplectus spp*

*Sorghum halepense*

Hexaploid

Tetraploid

Diploid



# Mutações de resistência a ALS em poliploides

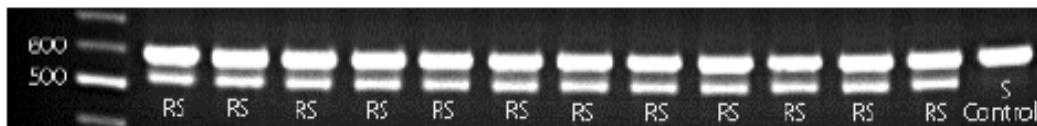
## Cópias múltiplas e introns

*Lindernia spp.* (Uchino and Watanabe, 2002)

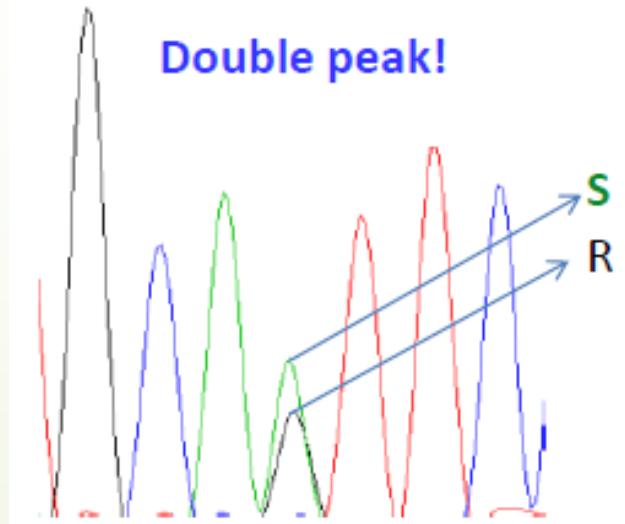
*Schenoplectus spp.* (Uchino et al. 2007; Scarabel et al. 2010)

## Heterozigoze

No RR genotype!

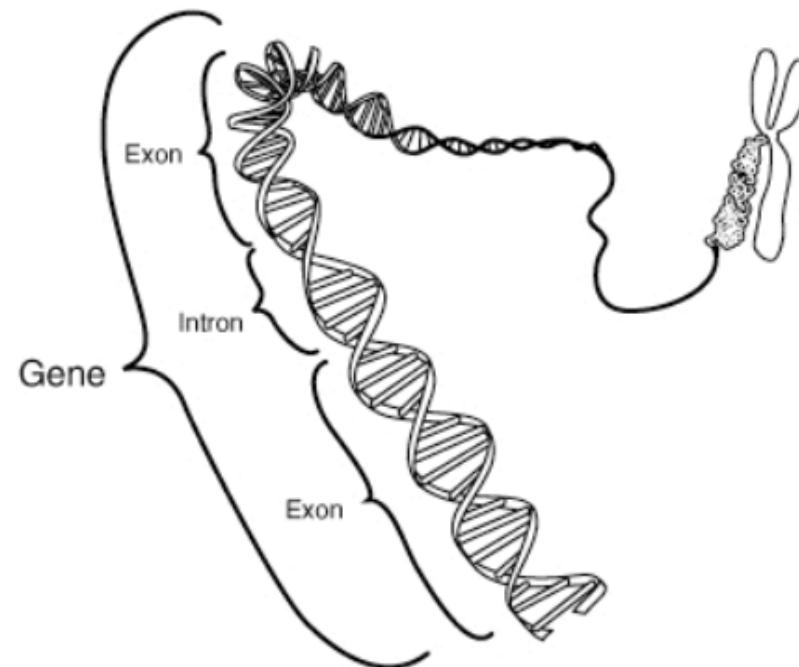


Double peak!



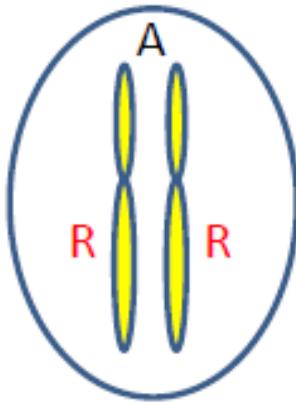
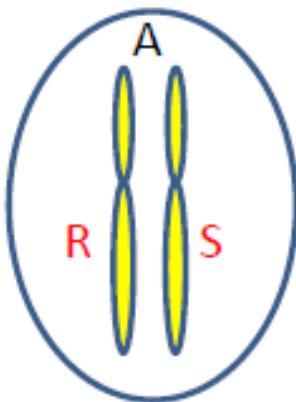
## Mutações de resistência a ALS em poliploides

Íntrons são regiões não-codificantes do RNA mensageiro, enquanto os exons são regiões codificantes do RNA m. Eles estão relacionados a uma etapa muito importante do processo de síntese protéica dos eucariontes, denominada “splicing”. Neste processo (cujo nome significa “ato de cortar” em português), regiões específicas do RNA mensageiro (os íntrons) são recortadas e eliminadas.

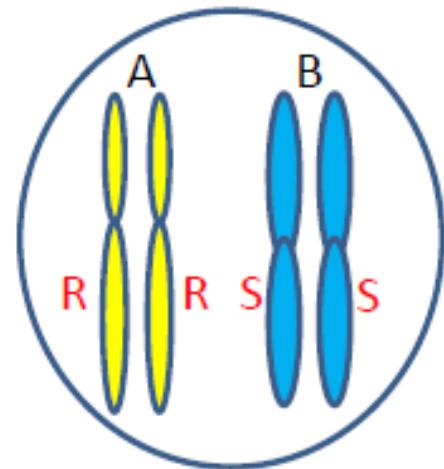
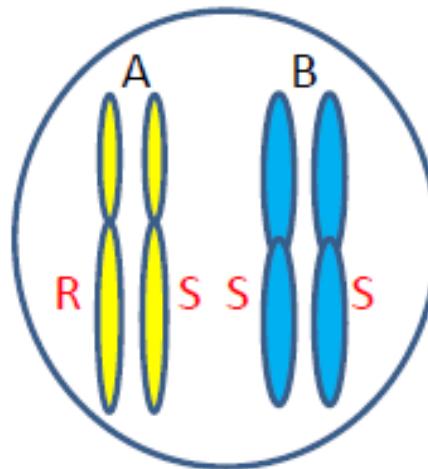


## Mutações de resistência a ALS em poliploides

Diploid



Polyplloid

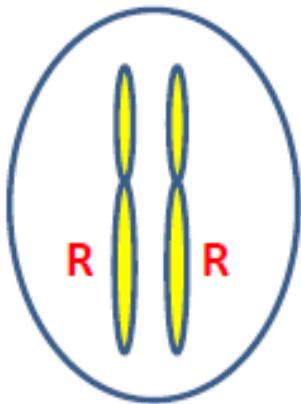


Gene copy-specific PCR-markers!

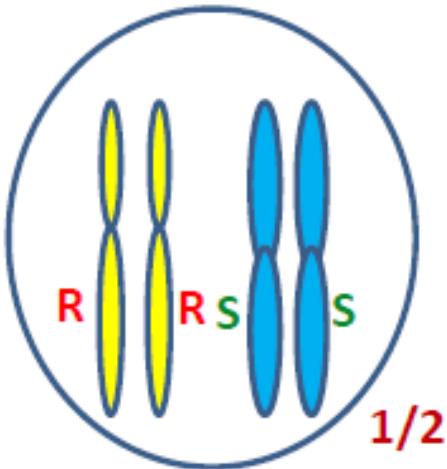
# Mutações de resistência a ALS em poliploides

Efeito de diluição de alelos múltiplos S

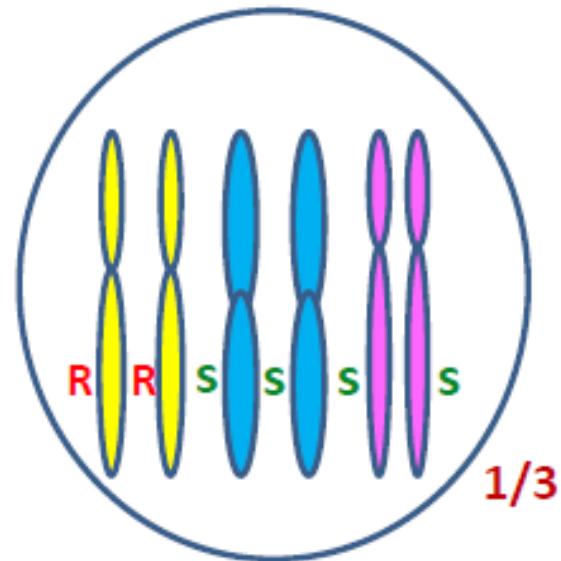
diplóide



tetraplóide



Hexaplóide



Assume se expressão igual dos genes, portanto, quanto maior a ploidia, maior a diluição

(Yu et al 2012, Panozzo et al. 2013)

## Mutações de resistência a ALS em poliploides

### ✓ Expressão da cópias de gene múltiplos

Pseudogenes (*Ohsako and Tominaga 2007*)

Silenced genes (*Iwakami et al. 2012*)

Differentially expressed genes (*Iwakami et al. 2012*)

Epigenetic regulations (*Scarabel et al. 2010*)

**Epigenética é o estudo das mudanças de expressão gênica, causada por mecanismos outros que não mudanças da sequencia do DNA e são hereditárias**

**Implicações na evolução da resistência???**

# Mutações de resistência a ALS em poliploides

Heredity

Heredity (2012), 1–12  
© 2012 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved 0018-067X/12  
[www.nature.com/her/](http://www.nature.com/her/)



## ORIGINAL ARTICLE

### Herbicide resistance-endowing ACCase gene mutations in hexaploid wild oat (*Avena fatua*): insights into resistance evolution in a hexaploid species

Q Yu<sup>1</sup>, MS Ahmad-Hamdan<sup>1,2</sup>, H Han<sup>1</sup>, MJ Christoffers<sup>3</sup> and SB Powles<sup>1</sup>

Many herbicide-resistant weed species are polyploids, but far too little about the evolution of resistance mutations in polyploids is understood. Hexaploid wild oat (*Avena fatua*) is a global crop weed and many populations have evolved herbicide resistance. We studied plastidic acetyl-coenzyme A carboxylase (ACCase)-inhibiting herbicide resistance in hexaploid wild oat and revealed that resistant individuals can express one, two or three different plastidic ACCase gene resistance mutations (Ile-1781-Leu, Asp-2078-Gly and Cys-2088-Arg). Using ACCase resistance mutations as molecular markers, combined with genetic, molecular and biochemical approaches, we found in individual resistant wild-oat plants that (1) up to three unlinked ACCase gene loci assort independently following Mendelian laws for disomic inheritance, (2) all three of these homoeologous ACCase genes were transcribed, with each able to carry its own mutation and (3) in a hexaploid background, each individual ACCase resistance mutation confers relatively low-level herbicide resistance, in contrast to high-level resistance conferred by the same mutations in unrelated diploid weed species of the Poaceae (grass) family. Low resistance conferred by individual ACCase resistance mutations is likely due to a dilution effect by susceptible ACCase expressed by homoeologs in hexaploid wild oat and/or differential expression of homoeologous ACCase gene copies. Thus, polyploidy in hexaploid wild oat may slow resistance evolution. Evidence of coexisting non-target-site resistance mechanisms among wild-oat populations was also revealed. In all, these results demonstrate that herbicide resistance and its evolution can be more complex in hexaploid wild oat than in unrelated diploid grass weeds. Our data provide a starting point for the daunting task of understanding resistance evolution in polyploids.

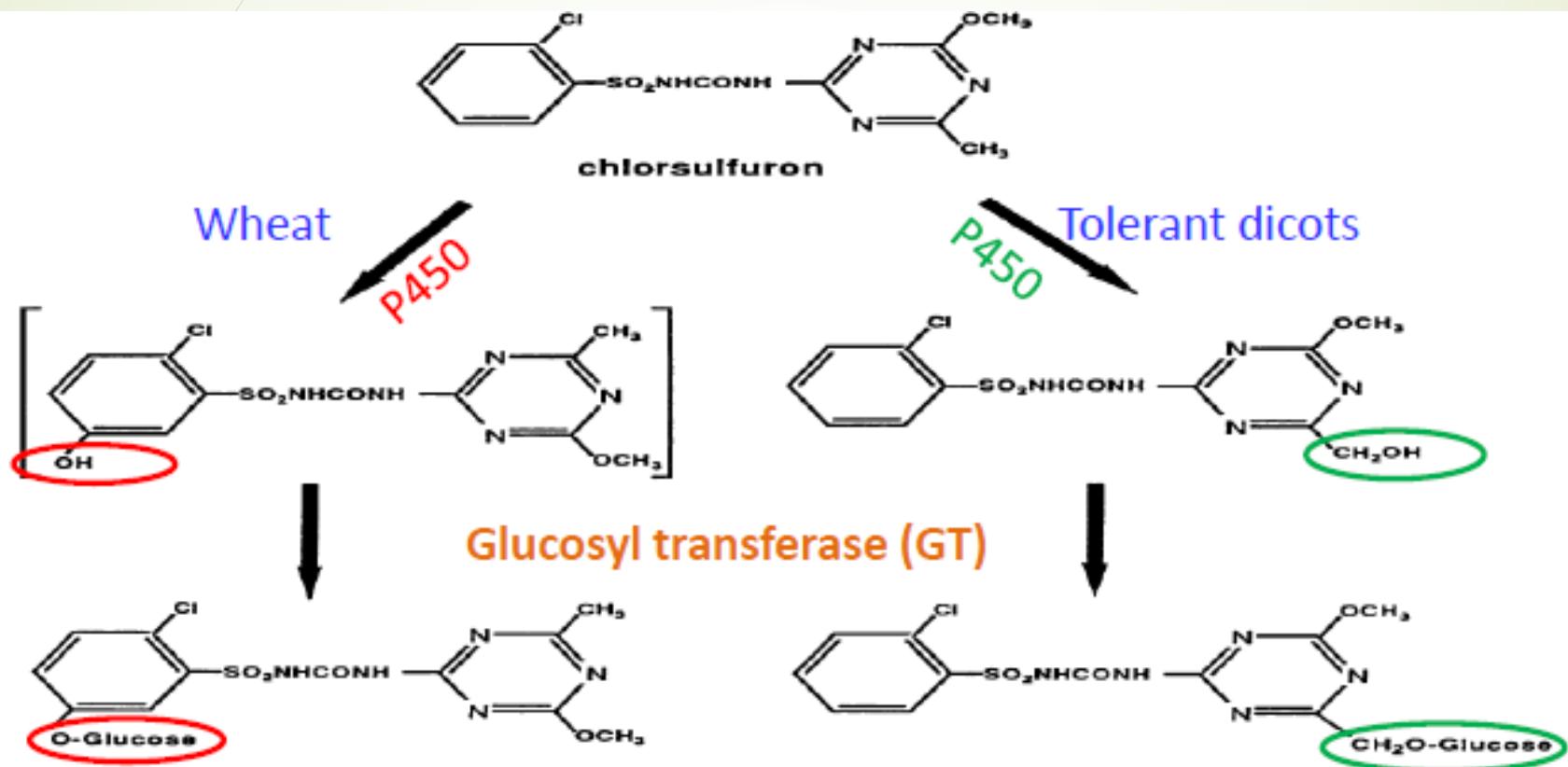
Heredity advance online publication, 10 October 2012; doi:10.1038/hdy.2012.69

**Keywords:** ACCase mutation; *Acc1*; herbicide resistance; hexaploid wild oat (*Avena fatua*); polyploidy; resistance evolution

## Metabolismo em culturas tolerantes

- ✓ Absorção - não
- ✓ Translocação - não
- ✓ Metabolismo - sim
  - ✓ Semelhante a tolerância das culturas
  - ✓ Incremento na taxa de metabolismo
  - ✓ Envolve citocromo p450, GTs
  - ✓ Resistência múltipla com outras classes de herbicidas

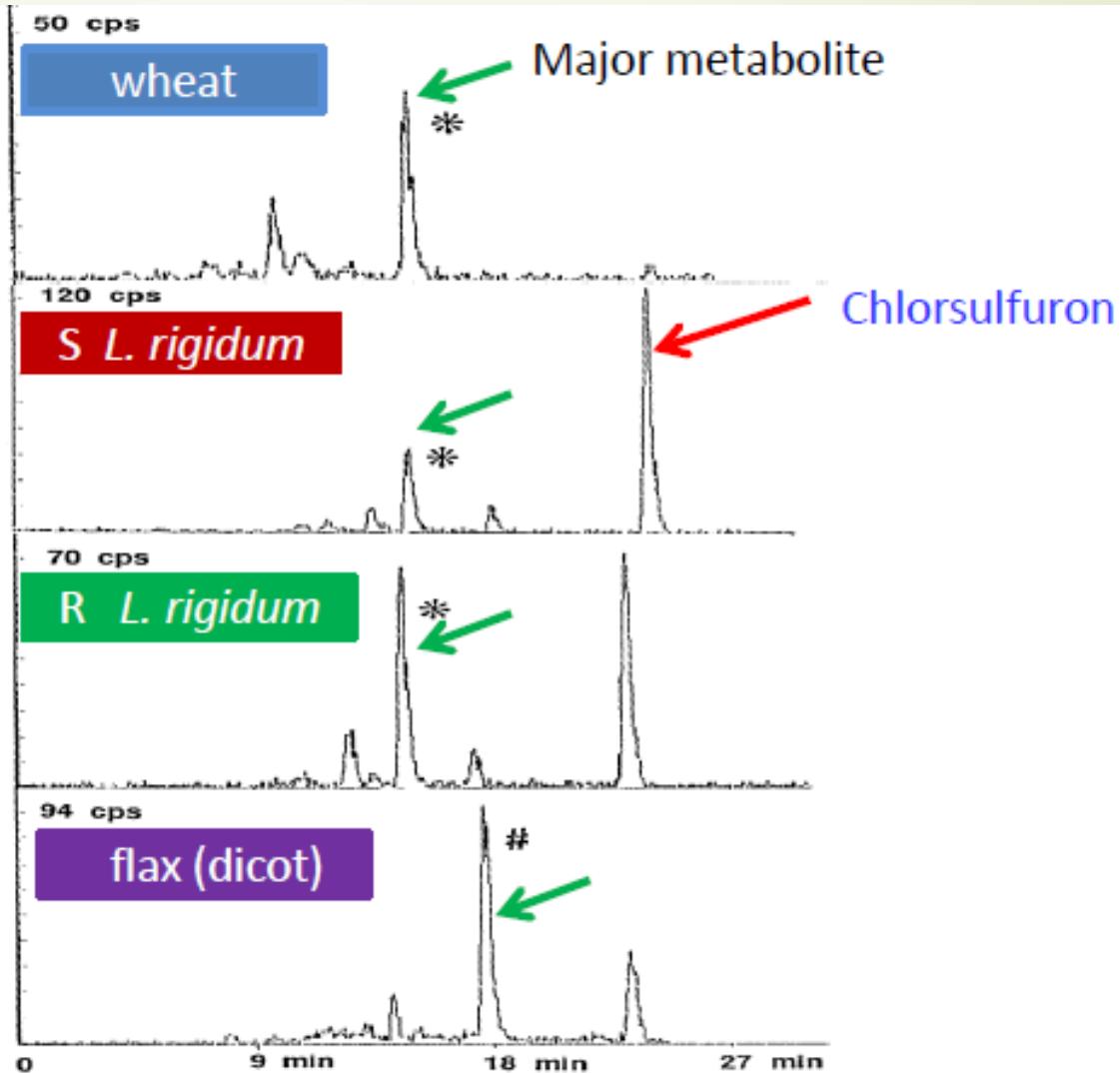
# Metabolismo em culturas tolerantes



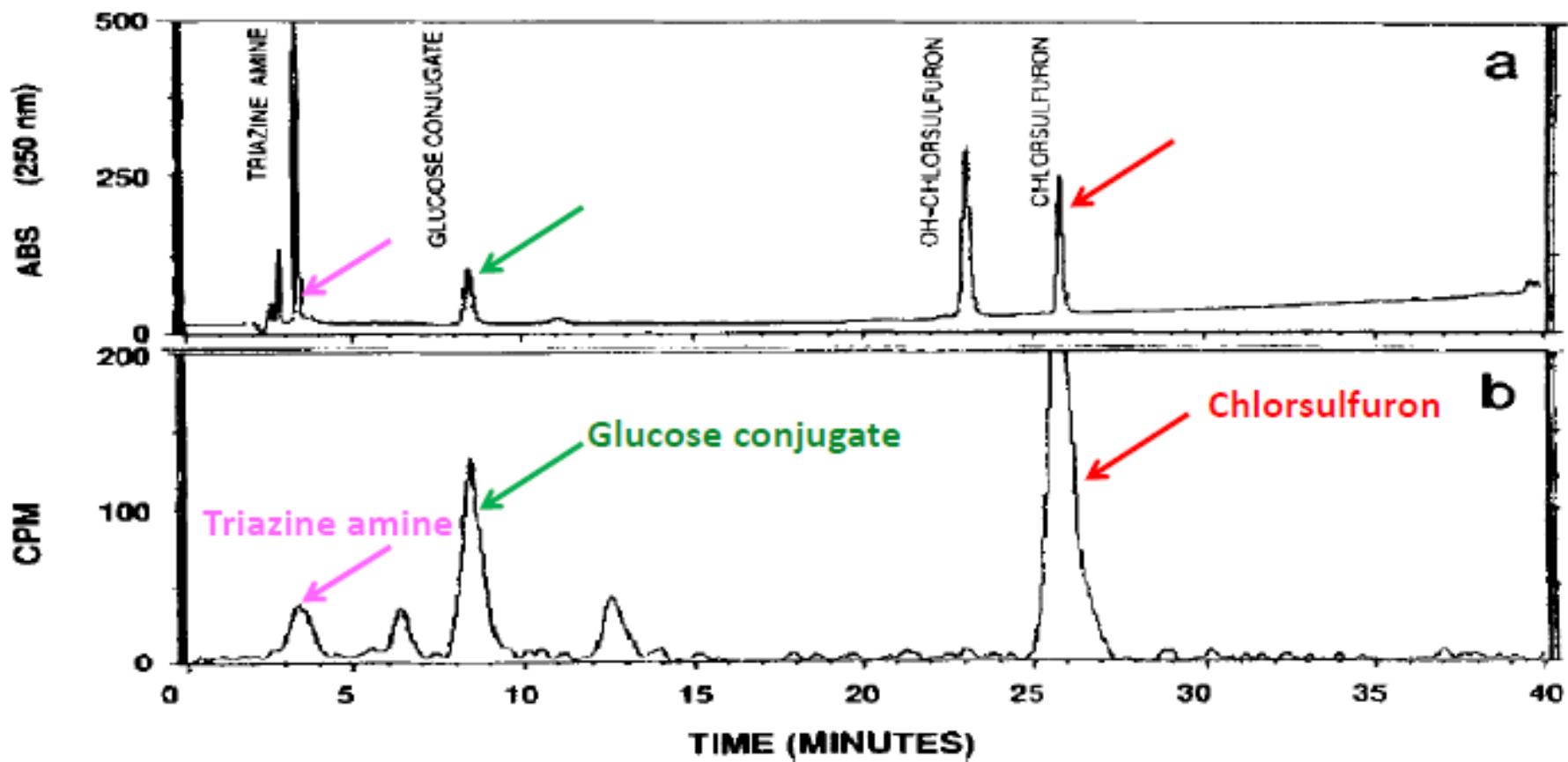
(Modified from Christopher et al. 1991)

## Chlorsulfuron metabolism in *Lolium.rigidum*

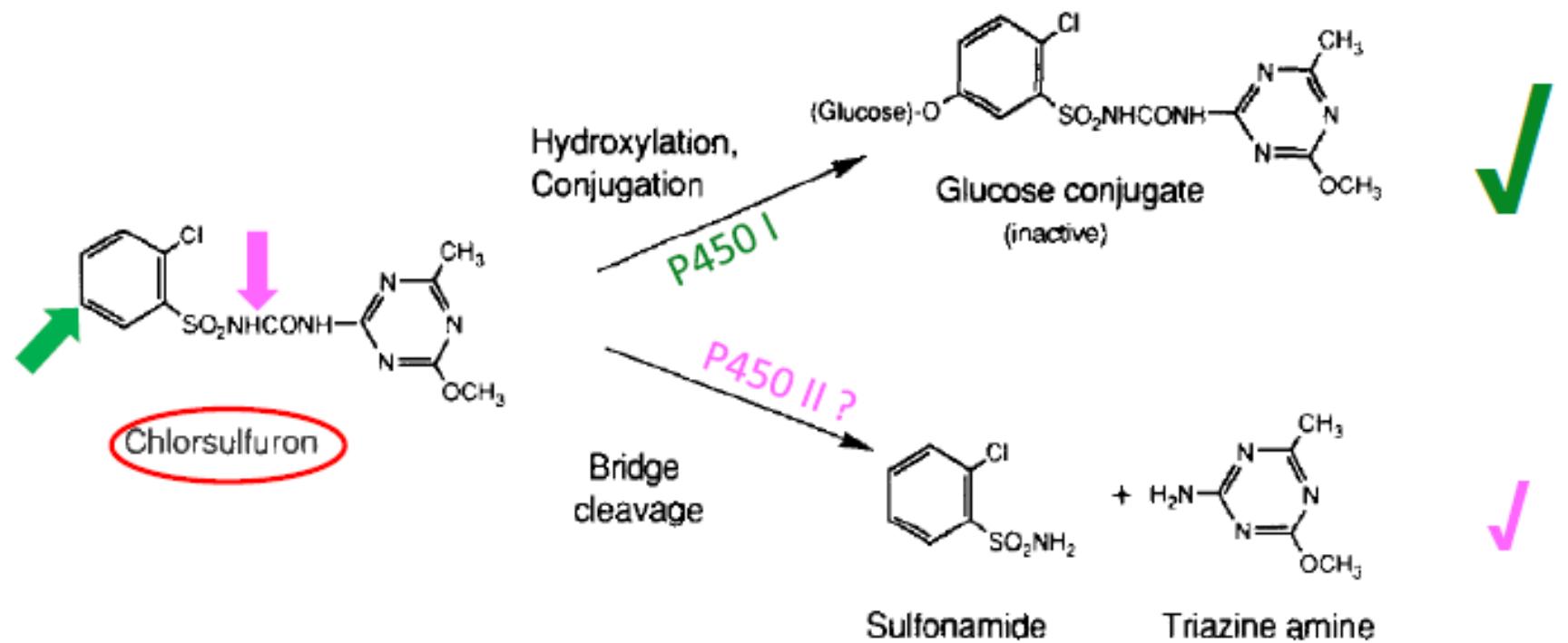
(Christopher et al. 1991)



## Chlorsulfuron metabolites in *L. rigidum*



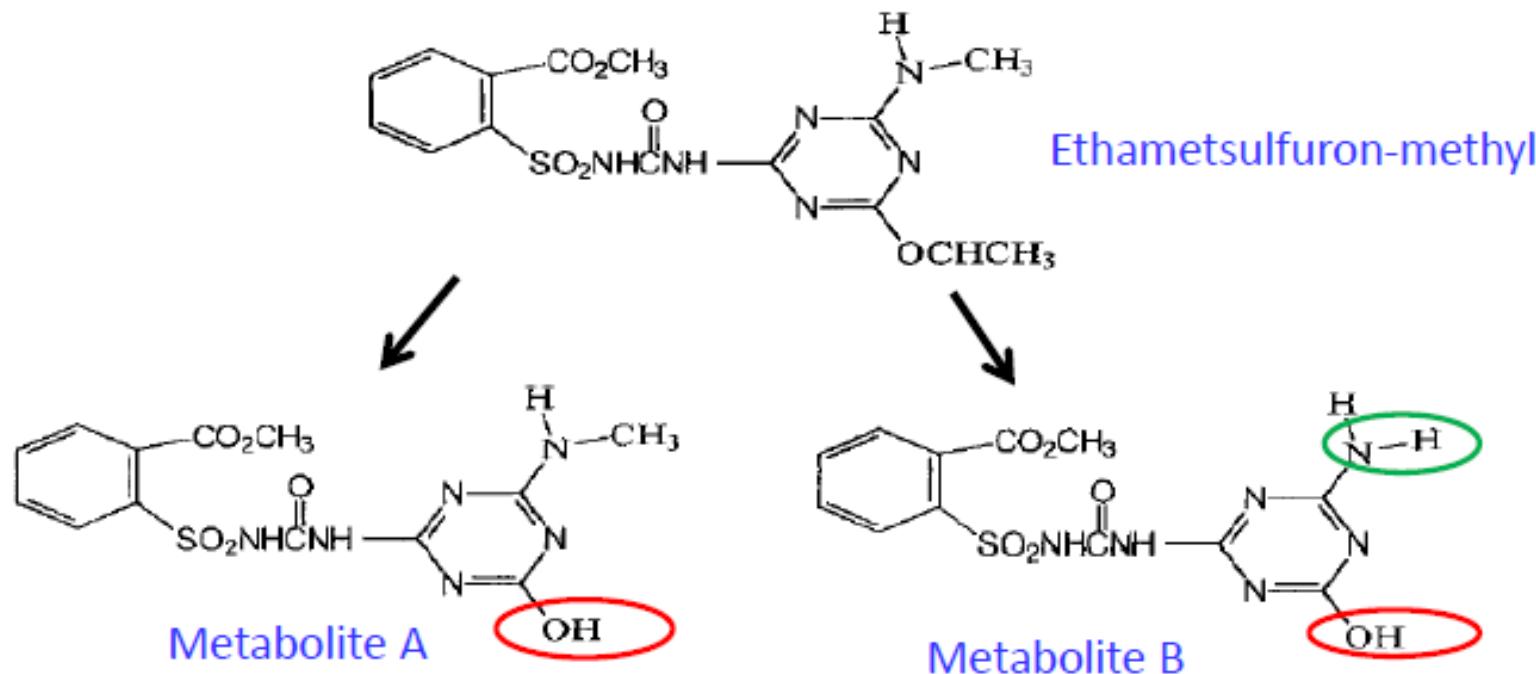
(Cotterman and Saari, 1992)



At least two P450s!

(Cotterman and Saari, 1992)

## Ethametsulfuron-methyl metabolism in *Sinapis arvensis* (dicot)



At least two P450s!

(Lichtner et al. 1995; Van Eerd and Hall, 2000; Veldhuis et al. 2000)



**Propoxycarbzone-sodium (SCT) in *Bromus tectorum***

**Penoxsulam (TP) in *Echinochloa phyllopogon***

Enhanced metabolism involving P450s

(Park et al. 2004; Yasuor et al. 2009)

## **“non target-site resistance” (NTSR)**

### **Controle genético**

- ✓ Genes nucleares
- ✓ Semi-dominante
- ✓ Poligênica (entre 1 a 3 genes)
- ✓ Quantitativa (interage com o ambiente)

### **Genes envolvidos**

- ✓ As plantas tem muitos genes envolvidos com a P450 (200 a 400)
- ✓ Para um dado herbicida, diferentes P450/GT podem estar envolvidos a nível de espécie, população e indivíduo dentro da população

(Preston 2003; Petit et al. 2010; Busi et al 2011, Han et al. 2013 unpub.)

## Pior cenário

**Consequências do uso de baixas doses de chlorimuron por 6 anos consecutivos em azevém**

- ✓ Esta população tem 6 mutações gênicas bem como metabolismo incrementado que conferem resistência (Christopher et al. 1992; Yu et al. 2008)

## Implicações

- ✓ Risco do uso de doses baixas e complicações do metabolismo das plantas no manejo da resistência

## Sumário

**Alteração no sítio de ação é o mais estudado. Muitas das mutações podem ocorrer e ser rapidamente abundante a população pois:**

- ✓ Alta frequência inicial do gene
- ✓ Codificado pelo gene nuclear, transmitido via polen e dominante
- ✓ Nenhum custo adaptativo

## Sumário

**Não alteração no sítio de ação é importante, mas  
mascarada e pouco estudada:**

- ✓ Tem sido comprovada
- ✓ Há necessidade de mais estudos genéticos
- ✓ Precisamos de ferramentas de diagnóstico
- ✓ Sinergismo pode superar a resistência metabólica  
(ex. malathion)

# Explorando a mutação do sítio de ação:

## Desenvolvimento de culturas resistentes a herbicidas

- ✓ Incrementar a seletividade marginal, possibilitar ou uso em “minor crops” e reduzir problemas de carryover
- ✓ Diversas culturas foram melhoradas para esta característica:
  - ✓ Milho, canola, beterraba, arroz e trigo
  - ✓ Seleção somática, melhoramento por mutação, transformação e cruzamento interespécifico
- ✓ No entanto, estas culturas resistentes aumenta ainda mais a dependência de ALS
- ✓ Poucos trabalhos tem sido dirigido para “minor crops”

## Avanços em modelos moleculares

- ✓ Modelos moleculares da ALS está sendo usado para identificar mutações virtuais que conferem resistência a outros herbicidas
- ✓ Semelhante a triazinas para elucidar o PSII, a resistência a ALS tem auxiliado em desvendar a síntese de aminoácidos alifáticos de cadeia lateral

## Explorando a mutação do sítio de ação:

### Marcadores genéticos de transformação de plantas

- ✓ Pela natureza genética dominante e alta magnitude de resistência, pode ser usado como marcadores de transformação de plantas

### Estudos de dinâmica de populações

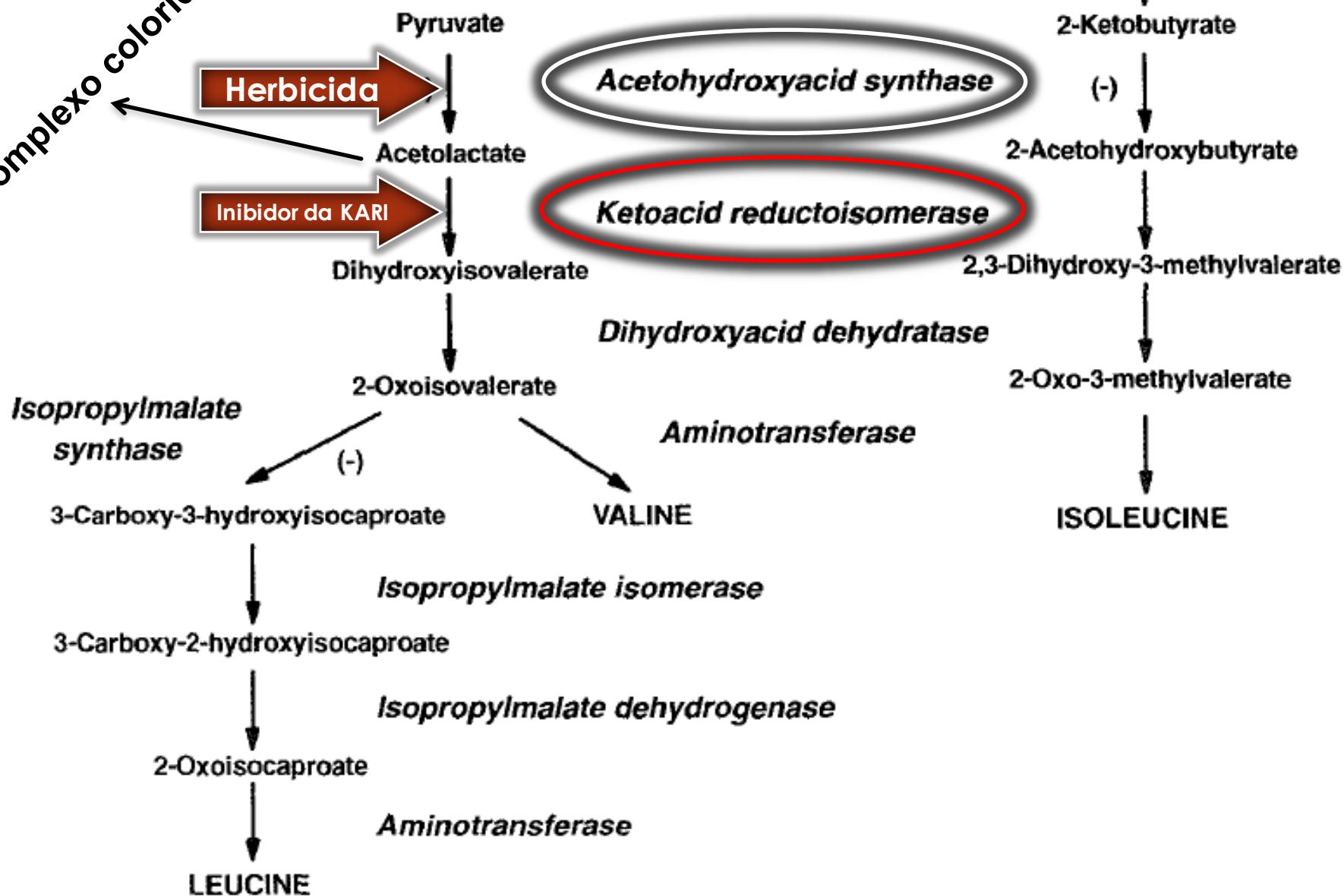
- ✓ Em populações mistas de plantas R e S é possível estudar a taxa de auto-cruzamento entre as plantas
- ✓ Estudar o movimento de polén em uma população
- ✓ Investigação de hibridação inter-específica (*A. Palmerii* x *A. hybridus*)

## Identificação de Resistência a ALS

**É possível detectar plantas resistentes a inibidores da ALS (sulfoniluréia) de forma rápida (2 a 3 dias) a partir de plantas no campo**

- ✓ É possível distinguir plantas daninhas R a SU – antes da aplicação do herbicida – antes dos sintomas serem observados
  
- ✓ As plantas daninhas S a SU exposta ao herbicida produz biomarcadores que são detectados 2 a 3 dias após a aplicação, através da coloração da solução

**Complexo colorido**



## Um método rápido para detectar plantas resistentes a herbicidas do grupo sulfoniluréia no campo



Developed at the National Environmental Research Institute (NERI), Aarhus University, Denmark. Patents pending.

### Collaborators

**Helle Weber Ravn**  
National Environmental Institute  
Aarhus University, Silkeborg, DK



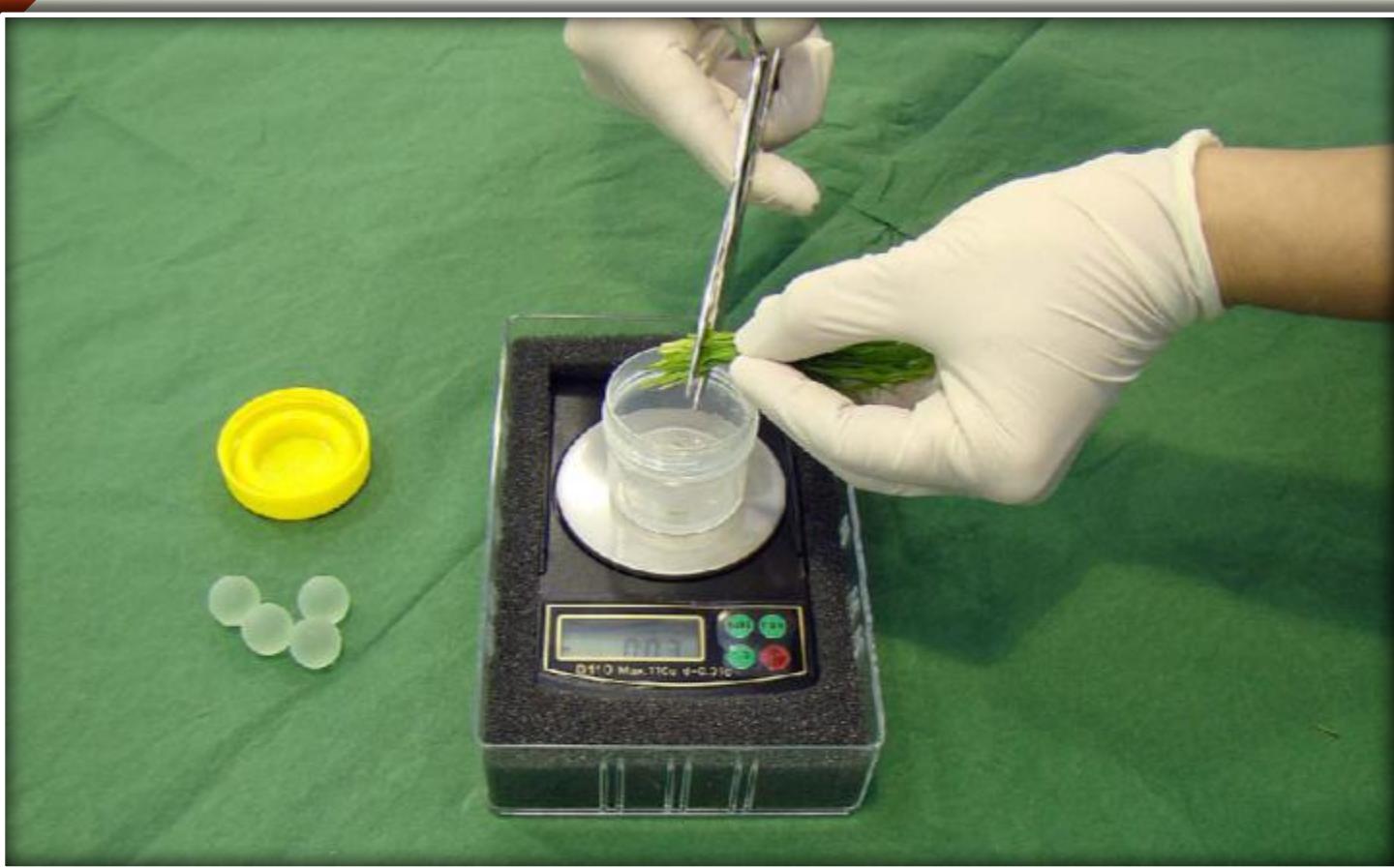
**Per Kudsk**  
Faculty of Agricultural Sciences  
Aarhus University, Flakkebjerg, DK



**Solvejg Mathiassen**  
Faculty of Agricultural Sciences  
Aarhus University, Flakkebjerg, DK



## Metodologia do Teste



Colete o material vegetal limpo, sem solo ou água. Utilize uma tesoura para cortar o grupo de plantas coletadas em pequenos partes e coloque em um recipiente.



Transfira as bolas de vidro para os recipientes junto ao material vegetal.



- ✓ Com cuidado, adicione parte do líquido das seringas no recipiente
- ✓ Tampe o recipiente e agite até o líquido ficar completamente verde e opaco



- Com cuidado, adicione o restante do líquido das seringas
- Feche o recipiente e agite novamente



- Sugar o líquido esverdeado com a seringa
- Utilizado um filtro junto a seringa, depositar o líquido em um copo plástico até esvaziar totalmente a seringa



- Com isso, o extrato está pronto para uso



- ✓ Utilize a pipeta para coletar o líquido do copo
- ✓ Mantenha a pipeta na posição vertical e deposite 10 gotas do extrato em outro copo plástico
- ✓ Depois adicione o dois reagentes ao extrato



- A mistura aquecerá até 70 °C quando inicia a reação química no copo



- Agite o copo com cuidado e coloque um disco circular no fundo do copo. Fazendo isso, a cor se distribui por todo o disco.

## Testing weeds

be performed within 10-14 days after spraying. Samples from areas in the field where herbicide resistance has been observed. Clip about 20-25 weeds per sample. Keep each sample in the enclosed zip-lock plastic bags. Conduct the test immediately; the plants can be stored in the refrigerator for up to 2 weeks.

## Preparing plant extract

Start by pressing the ON/OFF button. Remove the lid and make sure the scale is at level, see top right of the scale. In the yellow lids of the containers, remove the glass marbles in the lid and place one of the marbles in the scale, without the lid. Press the TIZ button and the

① Weigh out 0.20 grams of plant material for each test. Use only plants free of water and soil. Using scissors, cut pieces, measuring approx. 14 cm each, from a bunch of the collected plants for each sample, directly into their separate container.

② Transfer the glass marbles to the containers, and carefully add 3.5 ml of the liquid from the syringes into the containers, one syringe for each container/sample. (The plunger will then stand at 10 ml).

③ Close the lid tightly. Shake the plant material and liquid vigorously for 2 minutes (you can shake the three containers at the same time) until the liquid is completely green and opaque and only fibrous matter remains in the container.

④ Gently add the rest of the liquid from the syringes and shake for an additional 5 minutes.

⑤ Suck up the green liquid from each of

## Conducting the test

Conduct the test in a well ventilated room. Avoid inhaling the fumes that may develop. Handle reagents with care (see the warning labels on the back of this brochure).

For each of the 3 extracts is now following:



- ① Use the plastic pipette, situated next to the beaker with extract, to suck up the filtered extract.



- Holding the pipette in a vertical position, drip 10 drops of extract onto the circular disk in the beaker at the bottom.



- ② Hold the beaker horizontally slightly and add 2 drops of Reagent A (green liquid with a green cap), 2 drops of Sulphuric acid (yellow liquid with a white cap) in a 1:1 ratio.



- ③ This mixture will heat up to approx. 70 °C which should be visible in the beaker (the liquid will boil and fumes, which must not be inhaled, will develop).

Return the beaker to the box and let it cool off for approx. 5 minutes.

## Reading the results



- ① Shake the beaker carefully prior to placing a circular disk at the bottom of the beaker. By doing this, the colour is distributed evenly in the disk, and after 15 seconds the result can be compared to the enclosed colour scale.



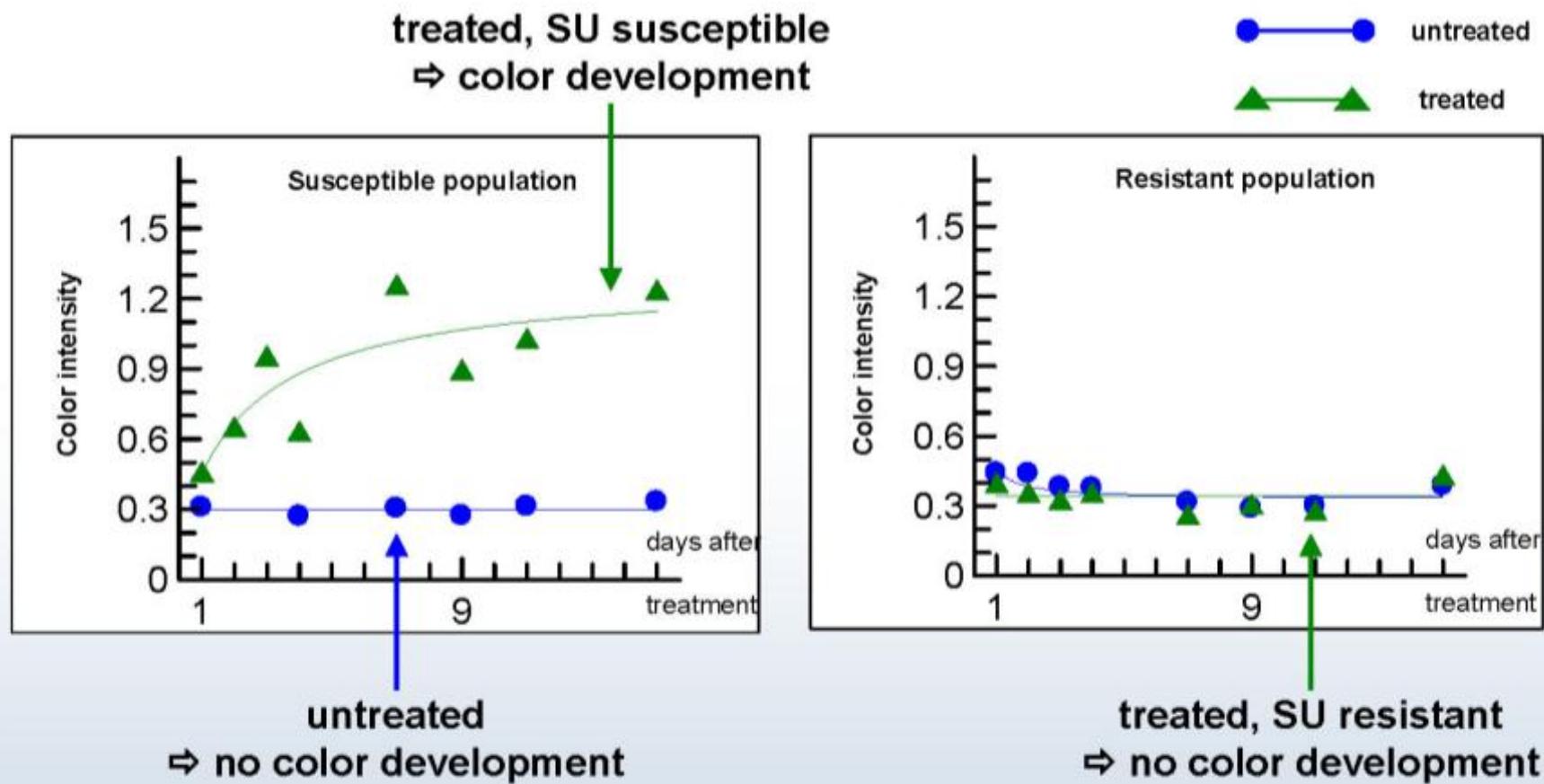
- ② Place the plastic beaker with the disc on the colour scale to the right, and compare the colours.

## Colour scale – Susceptible or resistant to herbicide



✓ Depois de 15 segundos, a cor do disco pode ser comparado a uma escala de cores.

## Validação do Conceito



Clear-cut differences in color intensities were obtained from 4 days after treatment onwards