

# Risco de Resistência a herbicidas inibidores da ALS em infestantes do arroz

Calha IM<sup>1</sup>, Mendes A<sup>1</sup>, Andrade E<sup>1</sup>, Canha G<sup>2</sup>, Setas F<sup>2</sup>, Zambujo  
J<sup>3</sup>, Pereira T<sup>3</sup>, Capela R<sup>3</sup>, Leitão M<sup>1</sup>, Fernandes ML<sup>1</sup>, Reis P<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INIAV – UEIS/SAFSV, Oeiras, Portugal

<sup>2</sup> LUSOSEM, Lisboa, Portugal

<sup>3</sup> APARROZ, Alcácer-do-Sal, Portugal

# Inquérito a produtores de arroz da BH Sado – Alentejo – sul de Portugal

Questionário a 30 Produtores de arroz

Questões sobre FACTORES AGRONÓMICOS (2013-2018):

- Sistema cultural (monocultura vs rotação);
- Historial de herbicidas (mesmo ou diverso MOA, mistura e sequência);
- Gestão de infestantes;
- Gestão da água;
- Percepção dos agricultores quanto à eficácia dos herbicidas sobre as diferentes espécies de infestantes .

# Principais infestantes - Alentejo

INFESTANTES MAIS PROBLEMÁTICAS – percepção dos produtores:

**Echinochloa spp.**

Escala de importância, relativamente a outras infestantes:

1º lugar (90 %) vs 2º ou 3º lugar (10 %).

<i>O.sativa sylvatica</i>	<i>Hetheranthera sp.</i>	<i>Echinochloa spp.</i>	<i>Alisma plantago aquatica</i>	<i>E. phyllopon</i>	TOTAL
1	1	25	2	1	30

NOVAS INFESTANTES (10 %):

***Oryza sativa ssp. sylvatica*** (3 %) e ***Leptochloa sp.*** (7 %).



# Resistência a Herbicidas - Alentejo

Percepção dos produtores de arroz:

INFESTANTES RESISTENTES – Presentes em 80 % campos arroz;

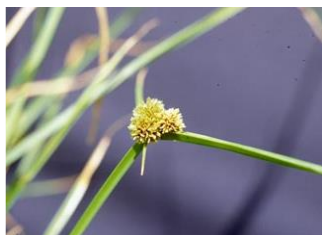
A maior parte dos casos referem-se uma única espécie:

POPULAÇÕES RESISTENTES DE ECHINOCHLOA SPP.

<i>O.sativa sylvatica</i>	<i>Hetheranthera sp.</i>	<i>Leersia oryzoides</i>	<i>Echinochloa spp.</i>	<i>Cyperus difformis</i>
3 %	3 %	3 %	74,23	1 %

FALHA DE EFICÁCIA ?

Em 20% dos campos, produtores referem –se a ‘várias’ espécies com populações resistentes, no mesmo campo ???

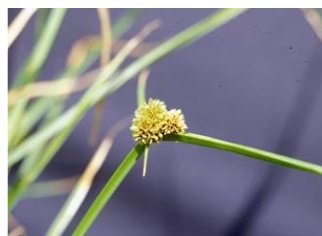


# Eficácia dos herbicidas – percepção dos produtores - Alentejo

## HERBICIDAS DE PRE- EMERGÊNCIA

Metade dos produtores **NÃO ESTÃO SATISFEITOS** com a eficácia dos herbicidas  
Apenas 13,3 % estão “satisfeitos” ou “muito satisfeitos” com a eficácia.

<u>EFICÁCIA DE HERBICIDAS DE PRE EMERGENCIA</u>		<u>Frequência</u>	<u>Percentagem</u>	<u>Percentagem acumulada</u>
		4	13,3	13,3
	Nada satisfeitos	2	6,7	20,0
	Pouco satisfeitos	9	30,0	50,0
	Média satisfação	11	36,7	86,7
	Satisfeitos	3	10,0	96,7
	Muito Satisfeitos	1	3,3	100,0
	<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>100,0</b>	

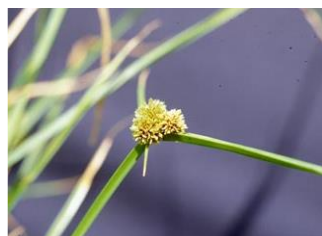


# Eficácia dos herbicidas – percepção dos produtores - Alentejo

## HERBICIDAS DE PÓS- EMERGÊNCIA

A Percepção dos produtores de arroz sobre a eficácia é SIMILAR À DOS HERBICIDAS DE PRÉ- EMERGÊNCIA

<u>EFICÁCIA DE HERBICIDAS DE PÓS EMERGENCIA</u>		<u>Frequência</u>	<u>Percentagem</u>	<u>Percentagem acumulada</u>
	Nada satisfeitos	5	16,7	16,7
	Pouco satisfeitos	9	30,0	46,7
	Média satisfação	14	46,7	93,4
	Satisfeitos	1	3,3	96,7
	Muito Satisfeitos	1	3,3	100,0
	<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>100</b>	

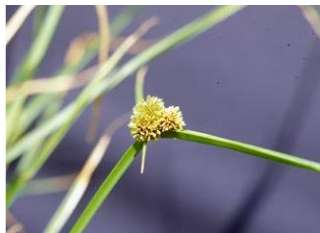


# Resistência a Herbicidas - Alentejo

CORRELAÇÃO NEGATIVA entre o recobrimento dos canteiros de arroz com *Echinochloa* e o nível de satisfação com a eficácia dos herbicidas de POS-EMERGENCIA .  
No entanto esta correlação não é significativa .

		Recobrimento do canteiro com						Total
		Echinochloa (%)						
		NA	0-20	20-40	40-60	60-80	80-100	
<b>EFICÁCIA DE HERBICIDAS DE POS-EMERGÊNCIA</b>	Nada satisfeitos	0	1	0	2	1	1	<b>5</b>
	Pouco satisfeitos	0	1	4	3	1	0	<b>9</b>
	Média satisfação	1	6	1	3	3	0	<b>14</b>
	Satisfeitos	0	0	1	0	0	0	<b>1</b>
<b>Total</b>		<b>1</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>29</b>

Ordinal por Ordinal	Gama	Valor	Erro Padrão Assintótico <sup>a</sup>	T Aproximado <sup>b</sup>	Significância Aproximada
		-0,342	0,202	-1,615	0,106
<b>N de Casos Válidos</b>		29			
a. Não considerando a hipótese nula.					
b. Uso de erro padrão assintótico considerando a hipótese nula.					



# História do campo – Alentejo

## Uso de herbicidas em arroz

Aplicação de Herbicidas de 2013 to 2017 (20 campos) ;

Comparação do ano de 2018 (30 campos) com a média do quinquénio - 2013 to 2017.

# História do campo – Alentejo

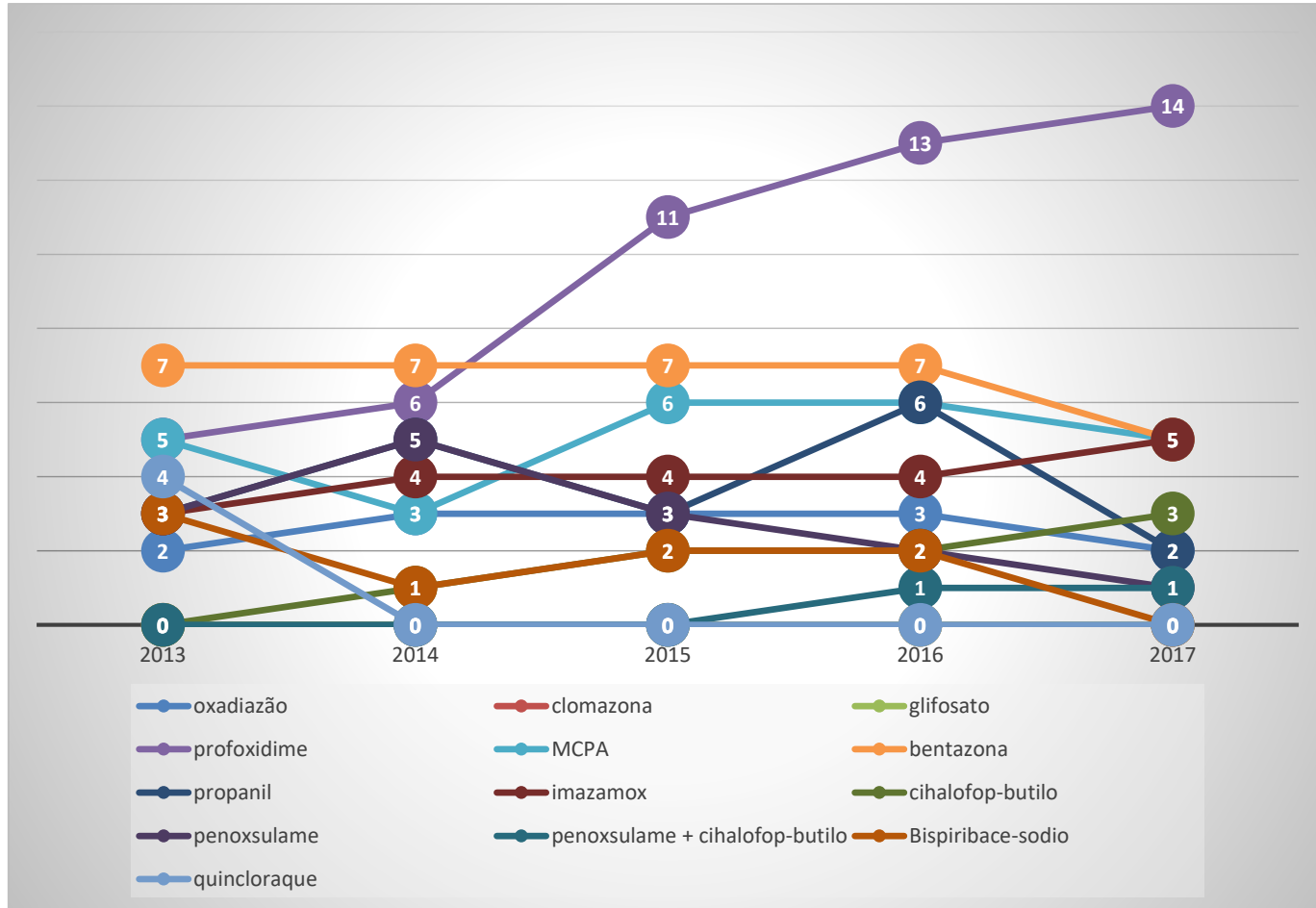
## Uso de herbicidas em arroz

Comparação entre o ano de 2018 e a média do quinquénio  
(2013 -2017)

HERBICIDAS	Média ( 2013-17)	2018	variação p.p.	variação p.p.
oxadiazão	13,8%	83,3%	69,6%	>>>
clomazona	0,0%	13,3%	13,3%	>
glifosato	0,0%	3,3%	3,3%	>
profoxidime	55,0%	83,3%	28,3%	>>
MCPA	25,0%	23,3%	-1,7%	<
bentazona	32,5%	43,3%	10,8%	>
propanil	20,0%	10,0%	-10,0%	<
imazamox	21,3%	46,7%	25,4%	>>

# História do campo – Alentejo

## Uso de herbicidas em arroz (2013-2017)



# Rotação de culturas - Alentejo

Arroz nos últimos 5 anos		Frequência	Percentagem	Percentagem valida	Percentaga acumulada
	NA	1	3,3	3,3	3,3
	No	7	23,3	23,3	26,7
	Yes	22	73,3	73,3	100,0
	Total	30	100,0	100,0	

Apenas 23,3 % dos produtores fazem rotação do arroz com outras culturas, no mesmo campo;

A monocultura do arroz, nos últimos 5 anos, é a prática mais frequente (73,3%), relativamente à rotação de culturas.

# Falsa sementeira - Alentejo

Falsa Sementeira					
		Frequen cia	Percent	Percent válida	Percentagem Acumulada
Válido	NA	2	6,7	6,7	6,7
	Não	26	86,7	86,7	93,3
	Sim	2	6,7	6,7	100,0
	Total	30	100,0	100,0	

Falsa sementeira com alagamento					
		Frequencia	Percentagem	Percentagem válida	Percentagem acumulada
Válida	Omissa	28	93,3	93,3	93,3
	Não	1	3,3	3,3	96,7
	Sim	1	3,3	3,3	100,0
	Total	30	100,0	100,0	

A Falsa sementeira NÃO é uma prática comum no Alentejo (86,7 %).  
Só foi registada em dois campos e apenas um com alagamento .

Para controlar as infestantes antes da sementeira, os produtores aplicam herbicidas,  
não recorrem a métodos mecânicos.

# A Resistência aos Herbicidas como força motriz da Mudança – Alentejo

A correlação entre algumas práticas culturais (variáveis) e a presença de infestantes resistentes indica que alguns produtores de arroz podem responder mais rapidamente a novas tecnologias, sistemas de produção ou produtos em campos com resistência – VONTADE DE MUDAR - .

Por exemplo:

- **Seis produtores** mudaram o programa de aplicação de herbicidas:
  - De Sistema Convencional para Tecnologia 'Clearfield'
  - De Sementeira Alagada para Sementeira a Seco (clomazona)
- Destes seis, cinco tinham infestantes resistentes no campo (83%), ligeiramente acima da percentagem de resistência em *Echinochloa* (77%).
- Apenas **três produtores** afirmaram terem mudado as práticas culturais, e todos eles tinham resistência nos campos .

# Vontade de mudar - Alentejo

		Resistência aos herbicidas		TOTAL
		Não	Sim	
<b>Mudanças no Programa de Aplicação de Herbicidas ?</b>	<b>NÃO</b>	6	18	<b>24</b>
	Clearfield	0	2	<b>2</b>
	Clearfield	0	1	<b>1</b>
	Nova s.a. clomazona	0	1	<b>1</b>
	Falta de eficácia	1	0	<b>1</b>
	Aplicação precoce	0	1	<b>1</b>
<b>Total</b>		<b>7</b>	<b>23</b>	<b>30</b>

# Vontade de mudar - Alentejo

		Resistência a Herbicidas		Total
		Não	Sim	
Mudanças nas Práticas Culturais ?	Não	7	20	27
	Mobilização anual	0	1	1
	Sementeira em linhas	0	1	1
	Sementeira a seco	0	1	1
Total		7	23	30

# Outros estudos sobre resistência

## PROSPECÇÃO DE RESISTÊNCIA AO PENOX SULAME

– ensaios de dose-resposta com planta inteira

## ESTUDO DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA AO PENOX SULAME

TSR – Detecção de mutações pontuais no gene *als*

## DISTINÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE ECHINOCHLOA

- Microsatélites .

## Assessment of genetic diversity of portuguese rice weeds from *Echinochloa* spp. complex using molecular markers

Mendes, A.<sup>1</sup>, de Andrade, E.<sup>1</sup>, Isabel M. Calha <sup>1\*</sup>  
<sup>1</sup> UESAFSV, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Quinta do Marquês, 2780-159 Oeiras  
 \*e-mail: isabel.calha@inivov.pt

**Abstract:** *Echinochloa* spp. are major worrying weeds causing significant losses in rice yields. In absence of weed control crop losses could attain in average, 70% . Management of *Echinochloa* spp. is crucial for optimum crop production. Prevention is a pre-requisite to reduce weed pressure in any crop and identification of weed species is much needed. This study characterized the genetic variation of 23 *Echinochloa* spp. accessions encompassing three rice producing areas from Portugal . To evaluate interspecific variability and identify the *Echinochloa* species present in rice field, namely *E. phyllopogon* (syn. *Echinochloa oryzicola*), *E. crus-galli* spp. *hispidula* (syn. *E. erecta*) *E. crus-galli* spp. *crus-galli* and *E. colona* (syn. *E. colonum*) 11 biomolecular markers were studied. The applicability of several candidate DNA barcodes to identify populations was assessed. Multivariate and univariate analyses were carried out to estimate genetic diversity within populations and among populations. This study is part of a larger project on sustainable production of rice in Portugal .  
**KEY words:** *Echinochloa*, SSR markers, identification.

### Introduction

There are four *Echinochloa* species reported in the Portuguese rice fields as exhibiting weedy characteristics, namely *E. phyllopogon* (syn. *Echinochloa oryzicola*), *E. crus-galli* spp. *hispidula* (syn. *E. erecta*), *E. crus-galli* spp. *crus-galli* and *E. colona* (syn. *E. colonum*). These species have a strong negative impact on the rice crop reducing the yield by approximately 70% (Oerke, 2006). The above discriminated species may be confused because the identification of the various *Echinochloa* species had been, for more than two decades, a big challenge for taxonomists. Although the characterization of the most frequent species in the Mediterranean region have been conducted up to a microscopic level (Costea and Tardif, 2002), the range of variation of the morphological traits was still high. The characterization and identification of the species is of great importance to provide information on the occurrence of new species (invasive) and on the effectiveness of weed control measures. In this study, we have tried to establish a set of SSR markers for the identification of the different species.

### Material and Methods

#### Plant material

In 2018, 23 *Echinochloa* spp. accessions were harvested in Mondego (M1-M10), Alcacar (A1-A7) and Ribatejo (R1-R6). All were considered as putatively resistant to the herbicide penoxsulame. For each accession, five seeds were randomly selected for DNA extraction and SSR analysis. Plants from the herbarium LISI were used as controls. All *Echinochloa* accessions were identified with the use of taxonomic keys of Pignatti (1982) and Carretero (1981).

#### SSR markers

EC1 and EC5 (Danquah *et al.*, 2002), EG-1, EG-2, EG-301, EG-302, EG-305, EG-306, EG-307 and EG-320 (Chen *et al.*, 2017) and PSMP2266 (Allouis *et al.*, 2001) were used.

#### SSR amplification

PCR amplification was conducted in a total volume of 10 µL. PCR mixture contained 3 µL of DNA, 0.4 µL of each primer, 5 µL of 2x master mix (NYZtech) and water to the final volume. The cycling program was: initial denaturation at 94 °C for 4 min, 35 cycles of 94 °C for 30 s, 57 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min, with a final extension step at 72 °C for 10 min. The amplification products were diluted 1:40 and combined with Hi-Di formamide and the size standard 500-LIZ (App.Bios) and separated on a 3500 ABI Genetic Analyser. Sample profiles were analyzed manually using GeneMarker v.2.4

#### Data analysis

The total number of alleles, frequency, genetic diversity were determined using GenDive 2.0b23. This software allows for the analysis of polyploids with unknown dosage of alleles.

#### Bibliography

Allouis *et al.*, (2001). *Theor Appl Genet*; 112: 1330-1305  
 Carretero (1981). *Ann Bot Gard* 58:91-108  
 Chen *et al.*, (2017). *Plant Diversity* 9: 287 +293  
 Costea M. & Tardif J.A. (2002). *Gen* 20: 155-168 <https://pubs.csiro.au/details/Document/110474?page/10>  
 Danquah *et al.*, (2002). *Molecular Ecology Notes* (2002) 2: 54-56  
 Oerke (2006). *Journal of Agricultural Science*, 144, 31-43  
 Pignatti (1982). *Flora d'Italia*, vol III. Agricola, Bologna, p 2324

**Acknowledgments:** The authors acknowledge: the funding support PEI-AGRI, PDR2020-101 031998; Dr. Teresa Vasconcelos, Herbarium João de Carvalho e Vasconcelos – LISI (ISA/UTL); Maria Clara Fernandes and Diogo Mendonça for all the technical laboratory support.

Resistência ao penoxsulame em 80 % das populações de *Echinochloa* spp.

TSR Mutaç o (Trp<sub>574</sub>Leu) N O detectada

### Results

Table 1. Major allele frequency, number of alleles, heterozygosity and Polymorphism Information Content (PIC) for the markers used in this study.

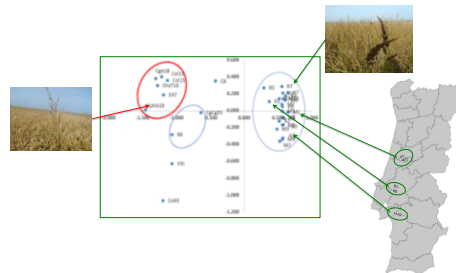
SSR marker	Major allele frequency	No. of alleles	Heterozygosity	PIC
EC1	1.000	1	0	0
EC5	0.439	3	0.608	0.9352
EG-1	0.308	9	0.806	0.0605
EG-2	0.369	9	0.763	0.7655
EG-301	0.469	4	0.558	0.7790
EG-302	0.429	9	0.650	0.6039
EG-305	0.968	2	0.021	0.7861
EG-306	0.657	3	0.408	0.1545
EG-307	0.349	7	0.726	0.7054
EG-320	0.333	4	0.694	0.6173
PSMP2266	0.307	8	0.777	0.775

Table 2. Nei's genetic distance. Relationship between populations.

Population origin	Mondego	Alcacar	Ribatejo	Herbário
Mondego	0,000			
Alcacar	0,242	0,000		
Ribatejo	0,145	0,112	0,000	
Herbário	0,086	0,079	0,085	0,000

Table 3. Amova results

Source of variation	d.f.	MS	% Var	F value
Within pop.	29	5,843	0,874	
Among pop.	3	12,693	0,126	0,126



### Conclusions

All but one of the 11 loci were polymorphic what was expected because all the EG-SSRs were developed for *E. phyllopogon* (Chen *et al.*, 2017). Due to this, our results suggest that all accessions harvested in the Portuguese rice fields, excepted the R6 have high probability of belonging to *E. phyllopogon* species. R6 has high probability of being *E. crus-galli* subsp. *crus-galli*. Because of the tetraploid nature of these species a small number (10) of SSRs are able to provide a high discrimination capacity among species; however the SSRs used were not able to find a correspondence between our 22 blind samples and the known genotypes from the herbarium, highlighting some incongruences. Further studies will be conducted to elucidate the identity of both our accessions and some of the herbarium specimens.

## +ARROZ – Produção sustentável de arroz em Portugal

- **APARROZ** AGRUPAMENTO DE PRODUTORES DE ARROZ DO VALE DO SADO LDA;
- **ANSEME** ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE PRODUTORES E COMERCIANTES DE SEMENTES;
- **GACHA** SOCIEDADE AGRICOLA, LDA;
- **INIAV** INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGAÇÃO AGRÁRIA E VETERINÁRIA IP.

