Consiglio Nazionale delle Ricerche

Meccanismi di azione degli erbicidi e basi genetiche e fisiologiche della resistenza

CNR -Istituto di Biologia Agro-ambientale e Forestale (IBAF)
Unità di Legnaro

L. Scarabel, M. Sattin , G. Zanin

Sommario

- Resistenza e impatto della nuova legislazione europea sui prodotti fitosanitari
- Erbicidi e meccanismi d'azione
- Meccanismi di resistenza delle malerbe
- Casi di studio: situazione della resistenza in 2 sistemi colturali

Un uso sostenibile e responsabile degli erbicidi appare indispensabile

La resistenza è un fenomeno evolutivo

L’uso ripetuto dello stesso erbicida o erbicidi aventi il medesimo meccanismo d’azione elimina ripetutamente le piante suscettibili mentre quelle resistenti possono riprodursi e disseminare formando cosi anche in breve tempo una popolazione resistente.

Famiglie chimiche diverse con medesimo meccanismo d’azione selezionano nella medesima direzione

Quali sono i fattori che influenzano l’evoluzione della resistenza

- La variabilità iniziale presente nella popolazione infestante relativamente al gene bersaglio dell’erbicida
- Il sistema di riproduzione della specie e il meccanismo di ereditarietà della mutazione
- La “fitness” degli individui resistenti
- Il flusso genico

Prodotti fitosanitari
-situazione in evoluzione-

- Riduzione dei p.a. disponibili in commercio

Riduzione dei meccanismi d'azione per coltura

Minore opportunità di ruotare erbicidi aventi diversi MdA

- Mancanza di introduzione sul mercato di prodotti nuovi con un diverso meccanismo d'azione
- Concentrazione su pochissimi meccanismi ad alto rischio di resistenza

Ricadute sul rischio di insorgenza e di evoluzione della resistenza

Erbicidi e meccanismi d'azione (MdA)

- L' azione fitotossica degli erbicidi è dovuta alla loro capacità di agire su processi fisiologici e biochimici vitali per la pianta: fotosintesi, sintesi aminoacidi, sintesi lipidi….

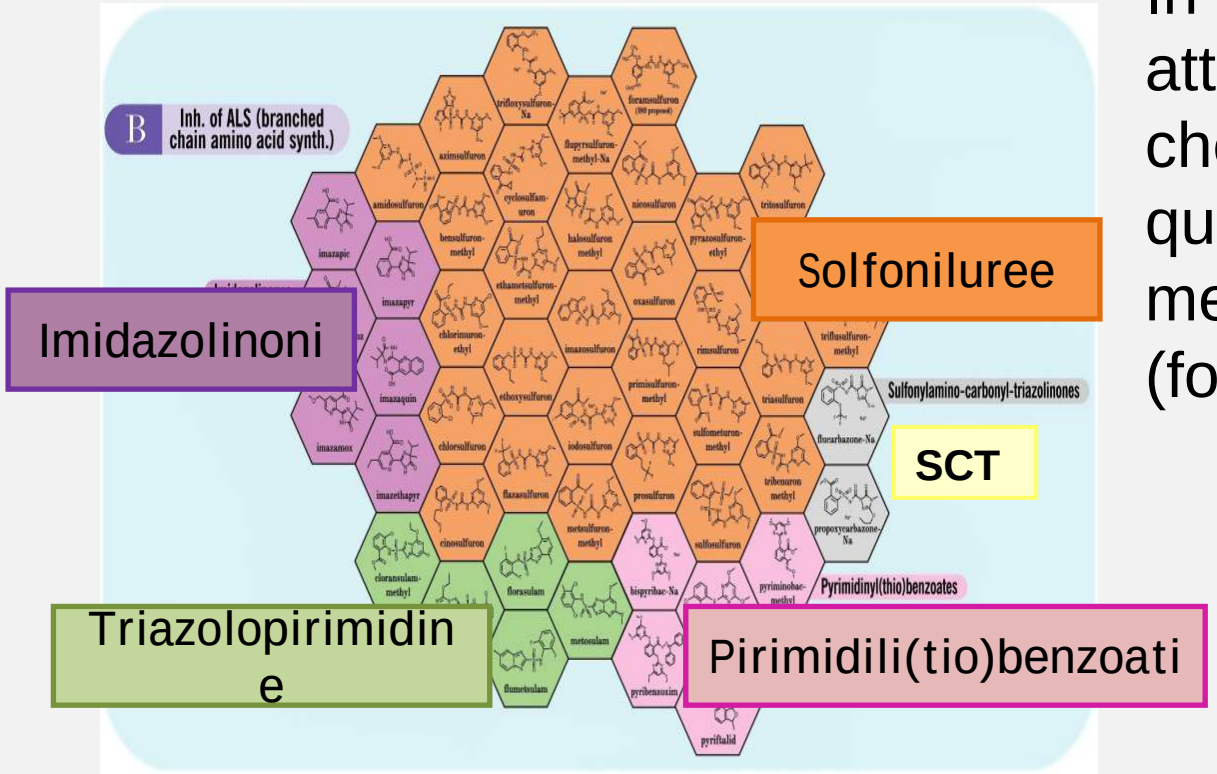
- Per meccanismo di azione si intende il meccanismo la precisa lesione biochimica (inibizione di una proteina enzimatica) o biofisica (trasporto degli elettroni) determinata dall'erbicida

Erbicidi e meccanismi d'azione (MdA)

- Varie classificazioni disponibili ma quella dell'HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) che si basa sul meccanismo d'azione degli erbicidi facilita la scelta degli erbicidi nella prevenzione/gestione della resistenza

- Consente all'agricoltore di impostare un corretto piano di diserbo alternando erbicidi con meccanismo d'azione diverso.

HRAC-gruppo B-inibitori dell'acetolattato-sintasi (ALS)



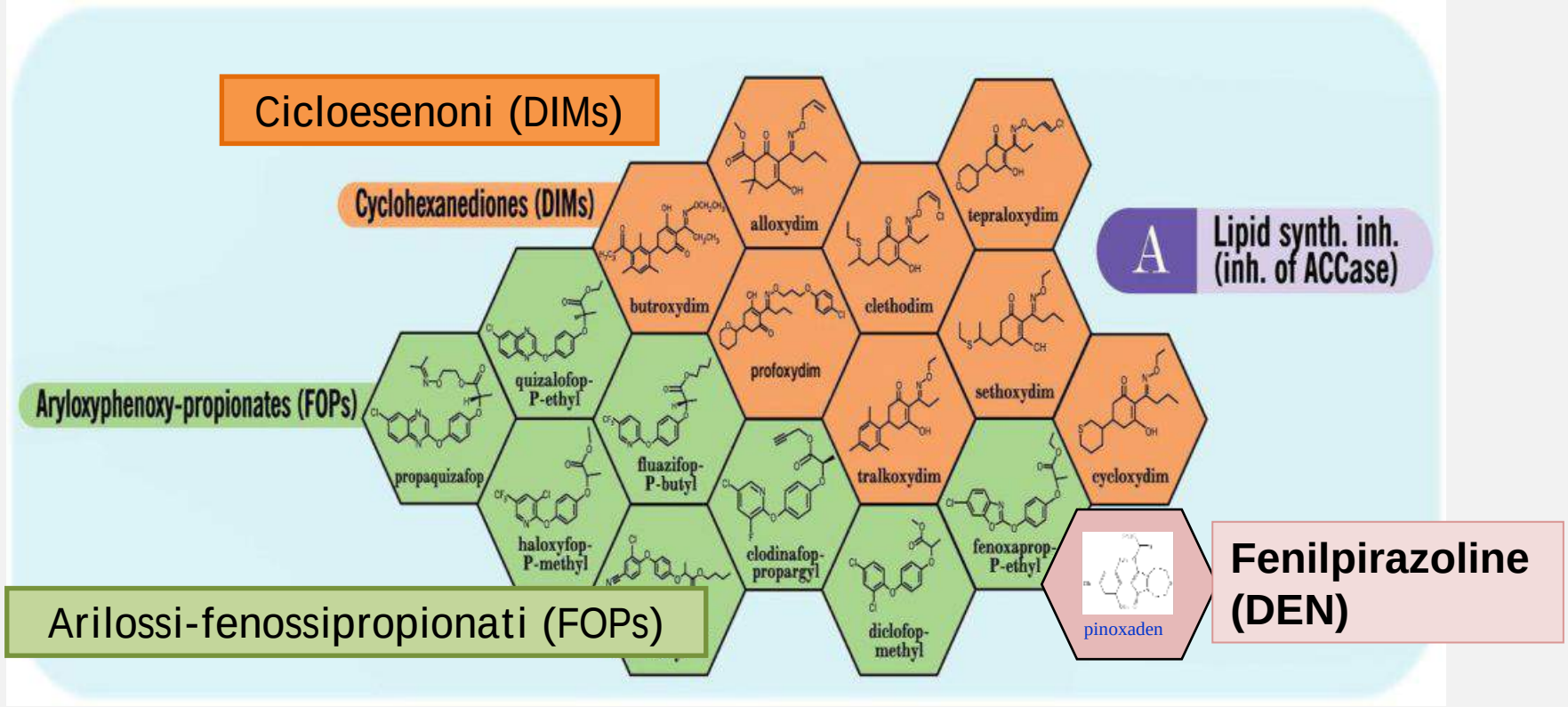
In totale, 26 sostanze attive autorizzate in Italia che corrisponde a un quarto degli erbicidi sul mercato italiano (fonte: GIRE)

- Il gruppo chimico più rappresentato è quello delle solfoniluree

HRAC-gruppo B-inibitori dell'acetolattato-sintasi (ALS)

- Inibitori della sintesi degli aminoacidi a catena ramificata (Val, Ile, Leu)
- Straordinaria attività biologica: pochi grammi di principio attivo per ha
- Alta selettività
- Controllo delle principali dicotiledoni, recente introduzione di SU con attività gramminicida (mesosulfuron + iodosulfuron nei cereali)
- Trattamento prevalentemente in post-emergenza

HRAC-gruppo A-inibitori dell'acetil-coenzima A carbossilasi (ACCasi)



Attualmente , 12 sostanze attive autorizzate in Italia (fonte:GIRE)

- Graminicidi
- Selettivi
- Trattamenti in post-emergenza

HRAC-gruppo G-inibitore dell'EPSP sintasi Glifosate

- Inibitore dell'enzima EPSP sintetasi che interviene nella biosintesi degli aminoacidi aromatici (Phe, Trp, Tyr) e di composti aromatici della pianta (acido folico, flavonoidi, vit. K, E)
- Erbicida sistemico non-selettivo
- Impiegato dal 1974, efficace contro infestanti annuali e perenni
- Presente nei più vari sistemi colturali (colture arboree) e con molti usi extra-agricoli

Altri meccanismi d’azione (MdA)

Gruppo O con gli erbicidi auxino-simili: 2,4-D, MCPA, MCPP

Gruppo C Inibitore della fotosintesi: triazine (terbuthylazine), triazinoni (metamitron, metribuzin), ammidi (propanile)

Meccanismi di resistenza

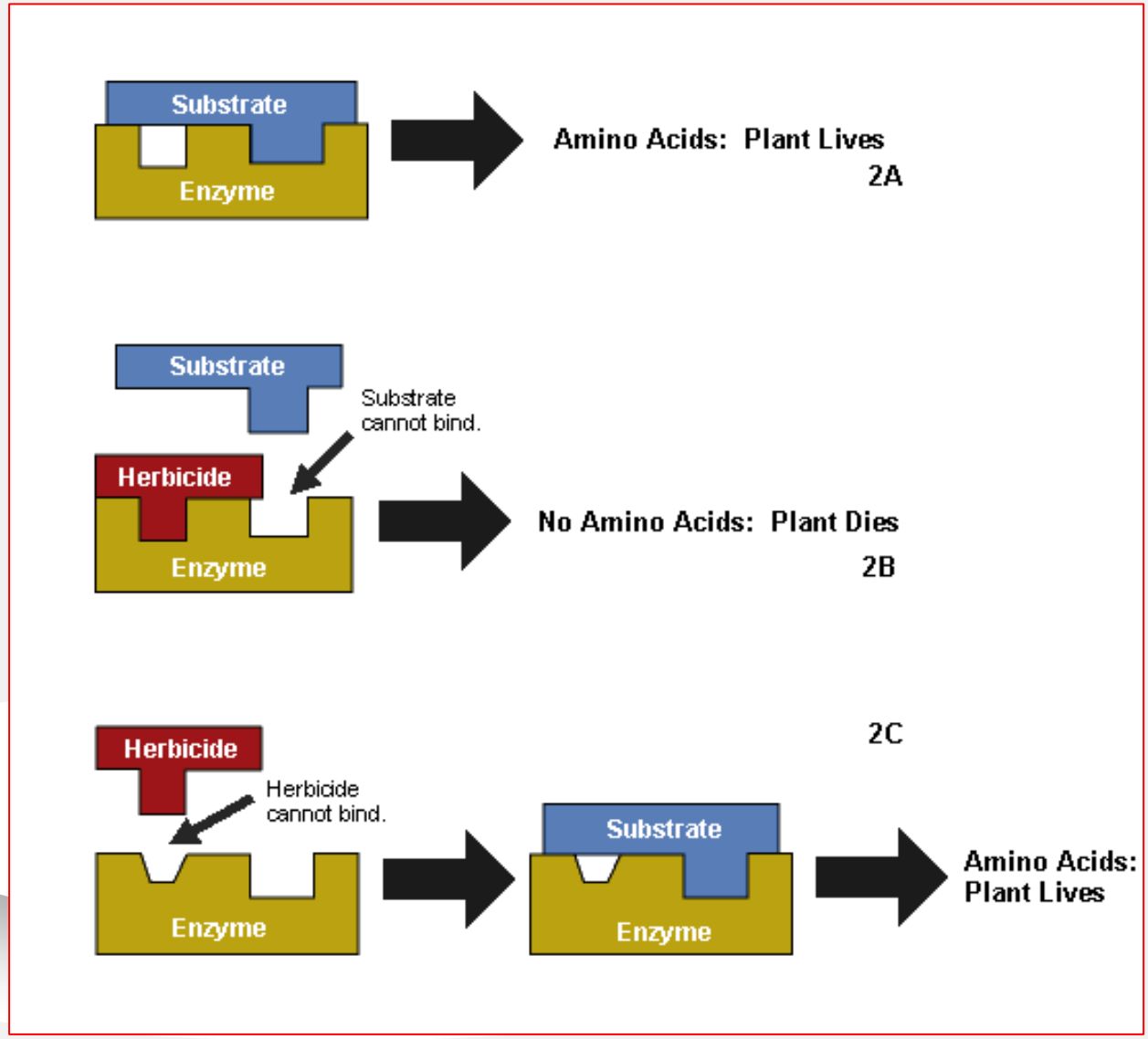
- 2 principali meccanismi:

- Mutazioni “target site” – l’erbicida non riesce a legare l’enzima bersaglio per una variazione sopraggiunta nel sito di legame

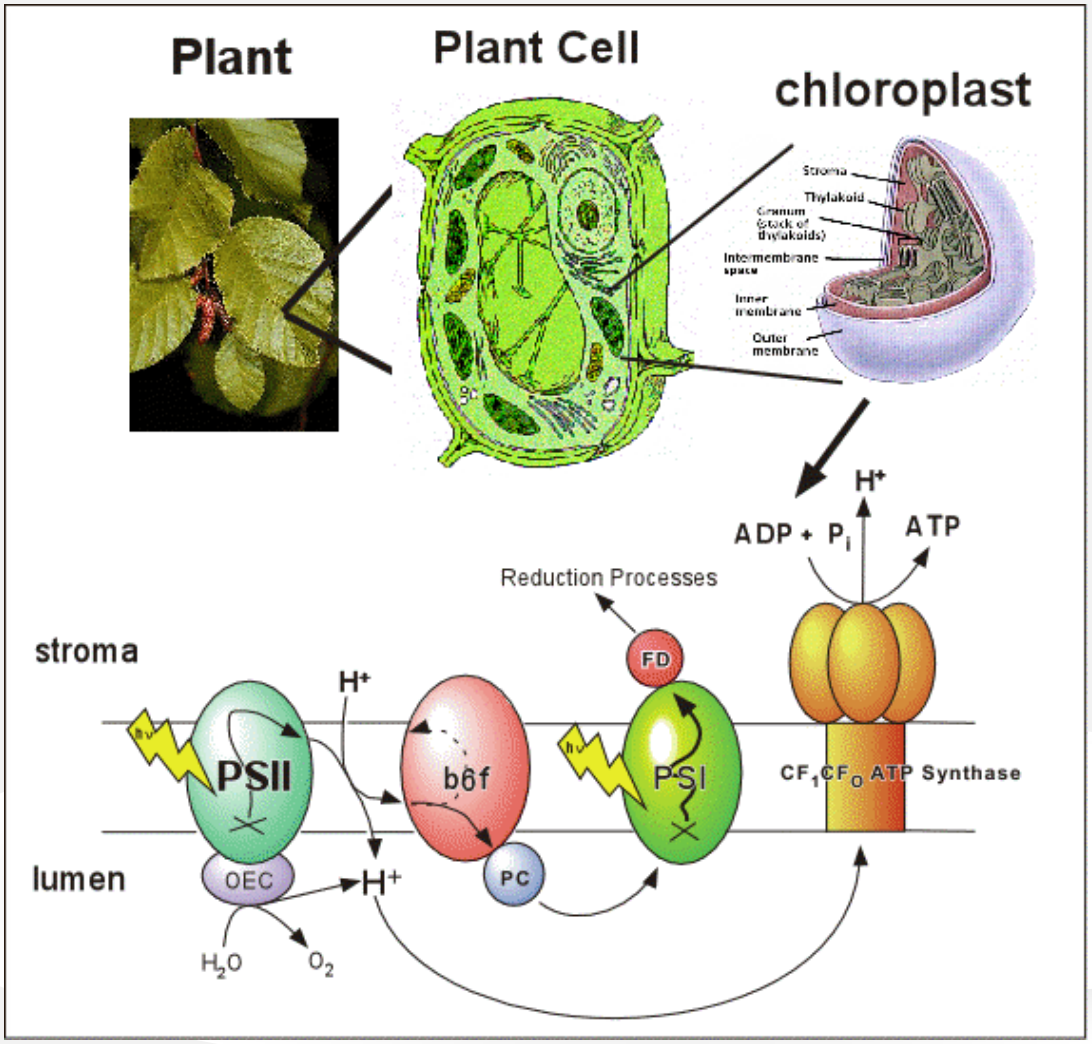
  Resistenza target-site

- Resistenza non target-site (NTSR)

Resistenza target-site



Resistenza agli inibitori del PSII



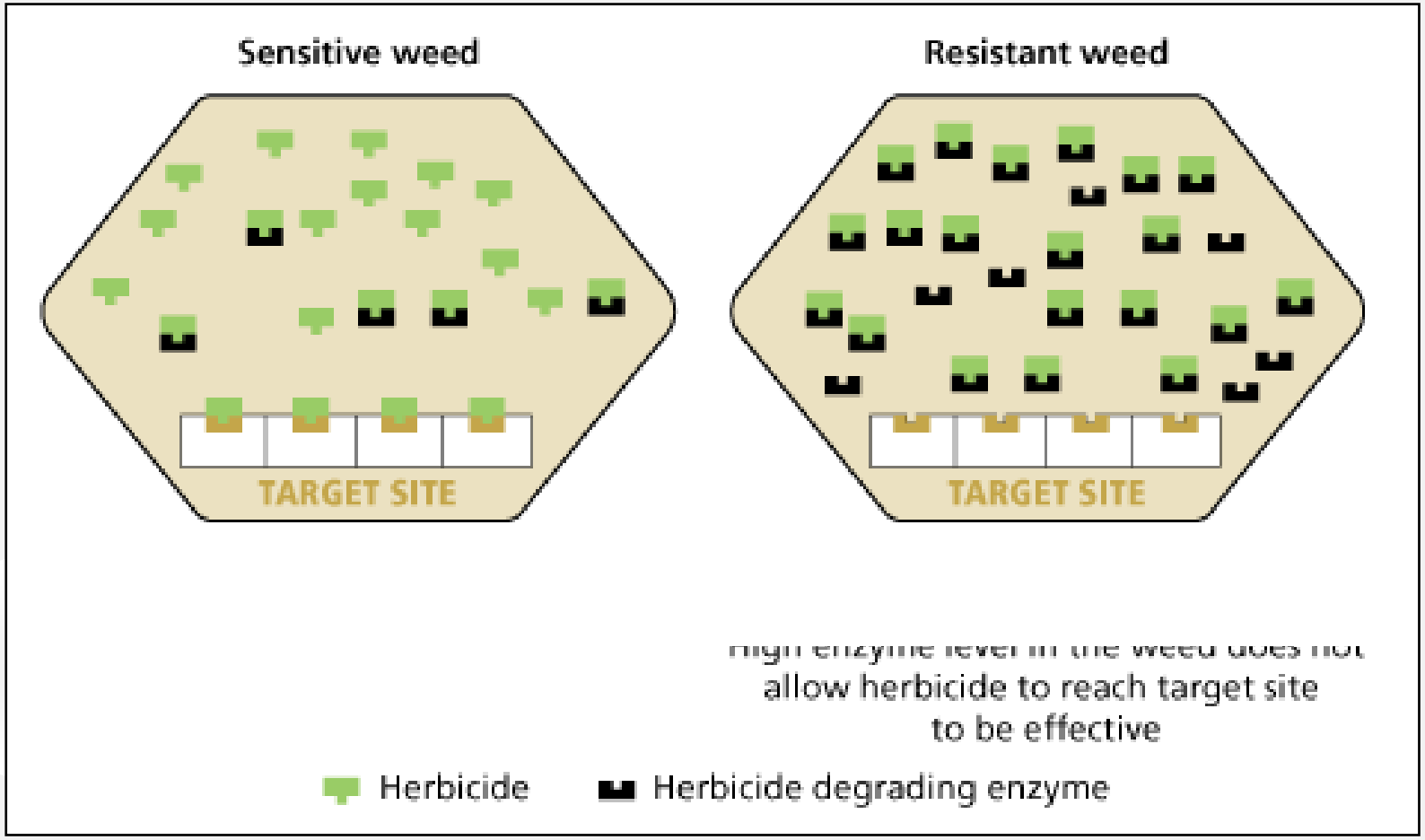
La triazina, la fenilurea e gli erbicidi uracilici inibiscono il fotosistema II legandosi alla proteina D1 e bloccando il trasporto degli elettroni. Nelle piante resistenti c'è una mutazione puntiforme nel gene cloroplastico che codifica per la proteina D1

Meccanismi di resistenza NTSR

- Assorbimento ridotto – l’erbicida non è assorbito in quantità letali.
- Traslocazione ridotta– l’erbicida non è trasportato nella pianta nel sito dove svolge la sua attività.
- Sequestro – l’erbicida è fisicamente rimosso dal sito in cui svolge la sua attività (es. nel vacuolo)

Meccanismi di resistenza NTSR

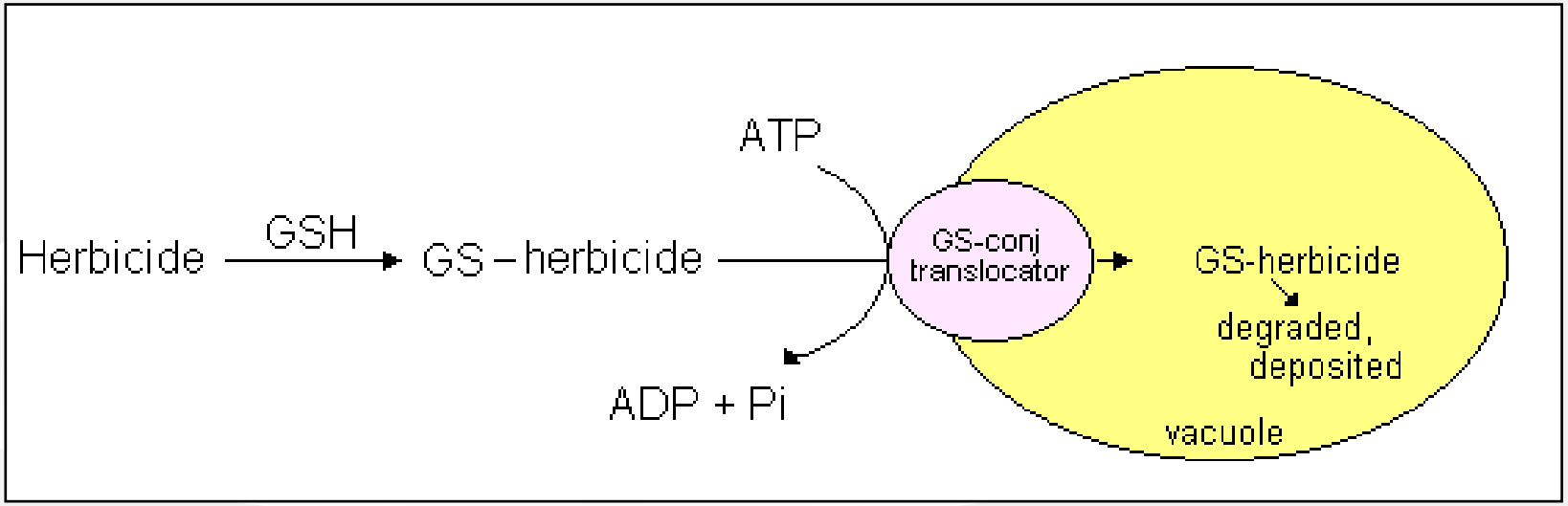
Resistenza metabolica: l'erbicida è detossificato prima che possa raggiungere il sito di azione.



Sistemi enzimatici che intervengono nel processo di detossificazione:

- Il sistema delle monoossigenasi a funzione mista comprendenti il citocromo P450 (mfo-P_{450})

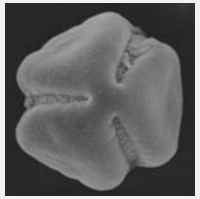
- Il sistema del glutatione –glutatione S transferasi (G-GST)



Ereditarietà monogenica della resistenza

- La resistenza ALS e ACCase è a eredità nucleare con parziale o totale dominanza.

Il gene di resistenza “viaggia” con il polline

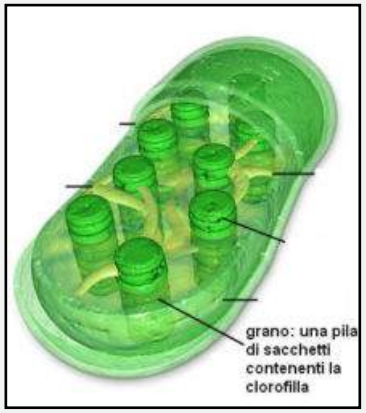


- Caso di resistenza al trifluralin in *Setaria viridis* dove la resistenza è controllata da un gene nucleare recessivo

La diffusione di una mutazione recessiva è favorita se la specie è autogama e se è molto prolifica.

Ereditarietà monogenica della resistenza

La resistenza alle triazine è ad eredità materna.



Una resistenza con eredità materna si fissa molto velocemente in una popolazione infestante a seguito del trattamento erbicida, poiché tutta la discendenza di una pianta resistente è resistente.

Ereditarietà poligenica della resistenza

- Affinchè la pianta sia resistente, deve accumulare un numero sufficiente di alleli favorevoli alla costituzione di un fenotipo resistente (numerose generazioni)

- L’ereditarietà è più lenta e la popolazione di malerbe incrementa gradualmente il livello di resistenza

Fitness

- Nella maggior parte dei casi, la resistenza non ha un evidente costo biologico quindi in assenza di erbicida i genotipi resistenti hanno fitness simile a quella dei genotipi sensibili

- Eccezione: *Solanum nigrum* resistente all'atrazina ha una riduzione significativa della fitness rispetto alle piante S.

La sospensione dell'erbicida selezionatore, determinerà un aumento graduale dei genotipi S rispetto agli R (diverso equilibrio allelico)

Riso

Tipologie di semina:

- Semina in acqua (70-75%)
- Semina interrata (25-30%)
- Fonte: **www.enterisi.it**

ERBICIDI PRE-SEMINA

P. A.	MECCANISMO DI AZIONE	HRAC	INFESTANTI TARGET	
			GRAM	DICOT
Flufenacet	Inibitore divisione cellulare	K3	++	+
Oxadiazon	Inibitore PPO	E	+	++
Cycloxydim	Inibitore ACCasi	A	++	
Glyphosate	Inibitore EPSPS	G	++	

ERBICIDI PRE-EMERGENZA

P. A.	MECCANISMO DI AZIONE	HRAC	INFESTANTI TARGET	
			GRAM	DICOT
Clomazone	Inib. biosintesi carotenoidi	F3	++	
Pendimethalin	Inibitore microtubuli	K1	++	+

ERBICIDI POST-EMERGENZA

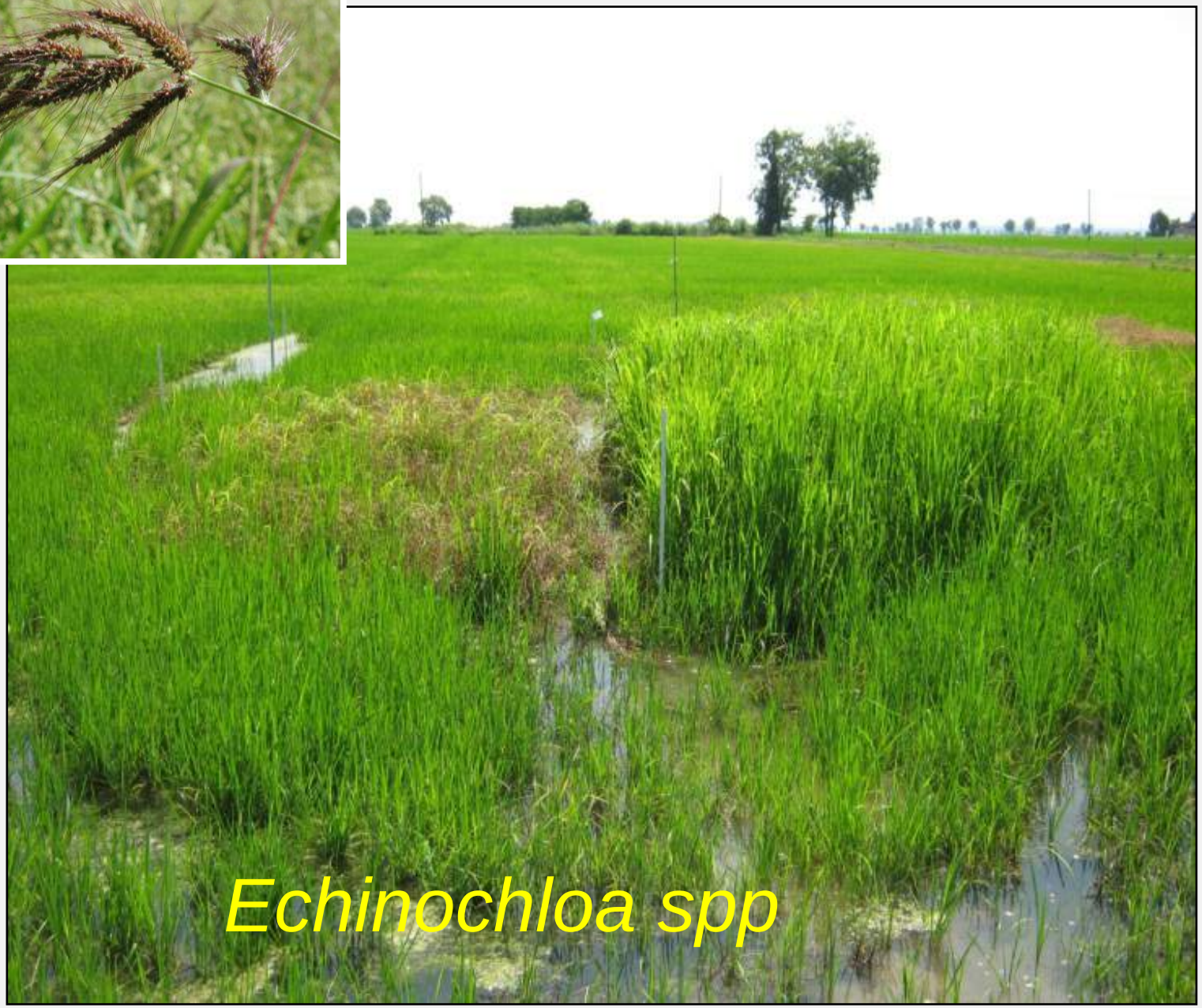
P. A.	MECCANISMO DI AZIONE	HRAC	INFESTANTI TARGET	
			GRAM	DICOT
MCPA	Azione auxino-simile	P		++
Triclopyr	Azione auxino-simile	O		++
2,4-DB	Azione auxino-simile	P		++
Propanile	Inibitore fotosintesi	C2	++	+
Cyhalofop butyl	Inibitore ACCasi	A	++	
Profoxydim	Inibitore ACCasi	A	++	
Azimsulfuron	Inibitore ALS	B	++	+
Imazosulfuron	Inibitore ALS	B		++
Penoxsulam	Inibitore ALS	B	++	+
Bispyribac-Na	Inibitore ALS	B	++	+
Imazamox	Inibitore ALS	B	++	+
Bensulfuron-methyl	Inibitore ALS	B		++
Halosulfuron-methyl	Inibitore ALS	B		++
Bensulfuron+Metsulfuron	Inibitore ALS	B		++
Orthosulfamuron	Inibitore ALS	B	+	++
Ethoxysulfuron	Inibitore ALS	B		++
Metosulam	Inibitore ALS	B		++

Sistema colturale riso

- Utilizzo prolungato e continuativo di erbicidi con il medesimo meccanismo d'azione: soprattutto inibitori dell'ALS in post-emergenza.

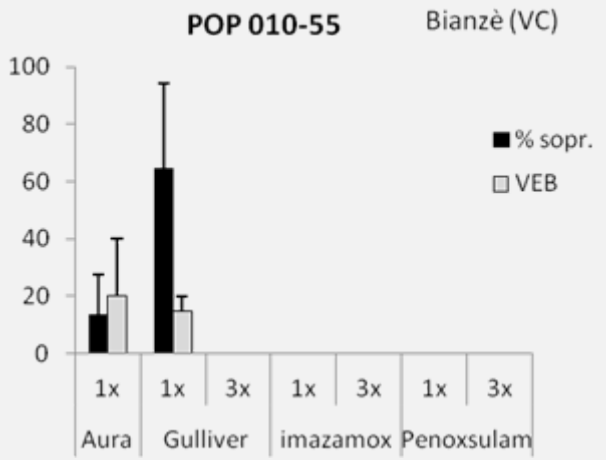
- Perdita di p.a. in commercio: es. quinclorac
  Pochi giorni fa deroga per l'uso del propanile a dose ridotte.

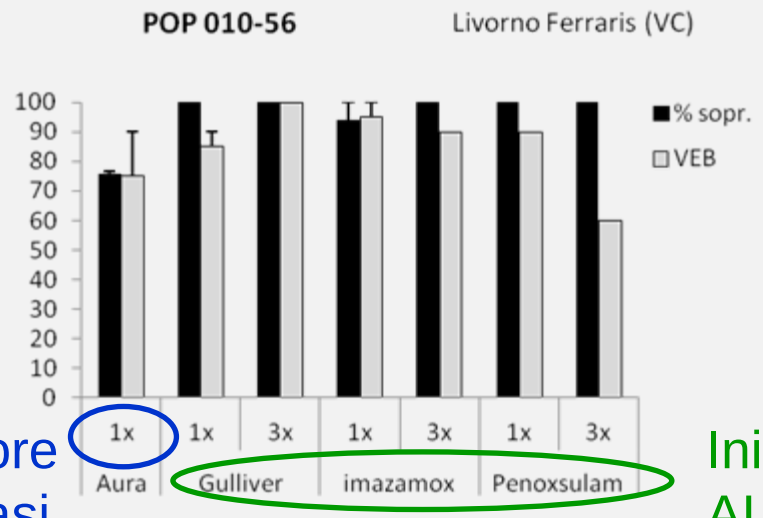
Pratiche che determinano una elevata pressione di selezione che favorisce l'insorgenza di popolazioni di infestanti resistenti


Echinochloa spp

Spettro di resistenza *Echinochloa crus-galli* in riso

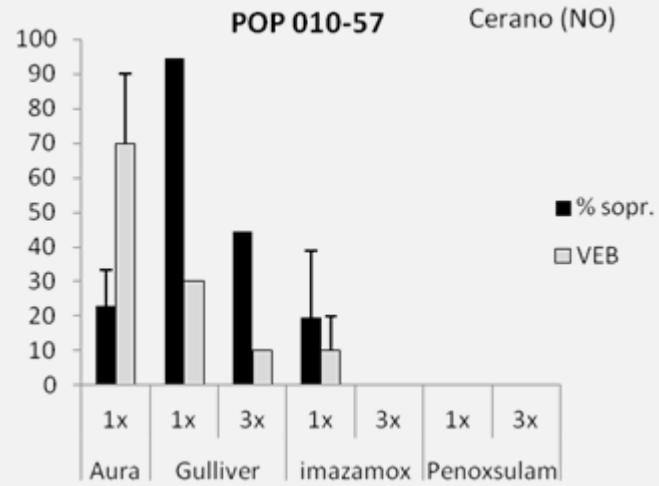
Eterogeneità dei pattern di resistenza

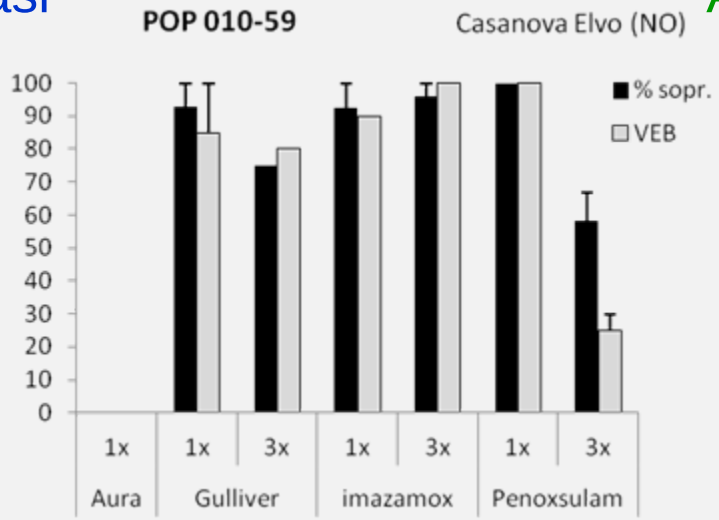




Inibitore ACCasi

Inibitori ALS





Echinochloa crus-galli

- Specie annuale a ciclo estivo molto competitiva
- In grado di colonizzare sistemi colturali molto diversi: riso, mais, pomodoro, soia e bietola
- Alta produzione di semi che rimangono vitali nel terreno per diversi anni anche in condizione di sommersione

Scalarità delle emergenze: anche 4-5 flussi se c'è acqua

Dose-risposta

Echinochloa crus-galli in riso

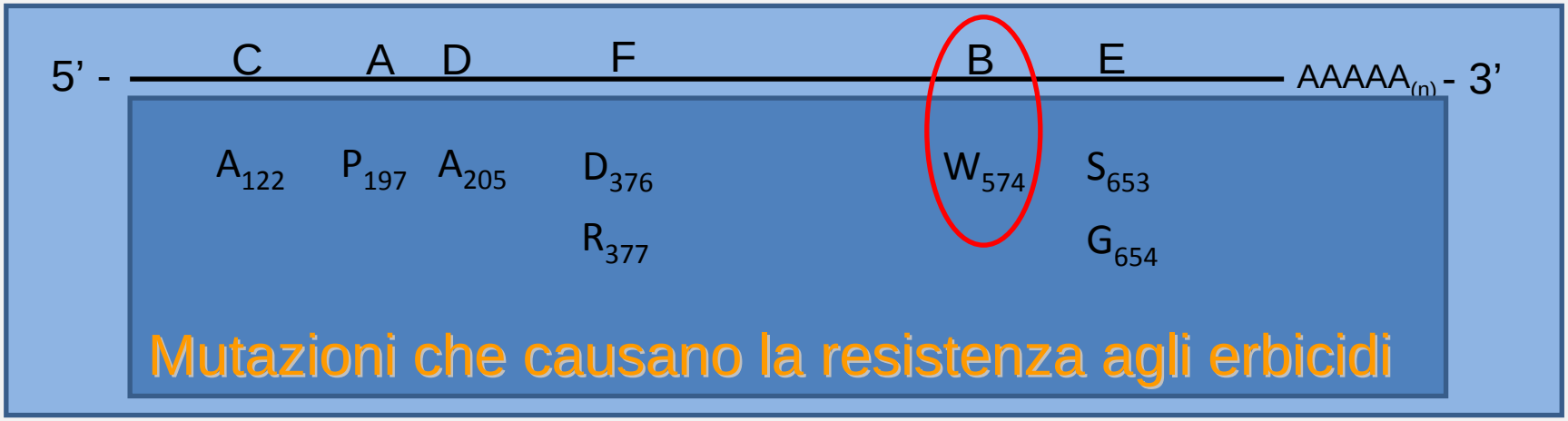
Sopravvivenza

	Erbicida					
	Inibitori ACCasi		Inibitori ALS			
	profoxydim		penoxsulam		Imazamox	
Pop.	ED_{50}*	RI** $_{07\text{-}16}$	ED_{50}	RI $_{07\text{-}16}$	ED_{50}	RI $_{07\text{-}16}$
07-16 (S)	74 (4.4)***	-	26 (1.5)	-	22 (1.2)	-
09-42L	-	-	>652	>25	>576	>26
09-44a	171 (3.9)	2.3	>652	>25	>576	>26
09-44c	181 (6.8)	2.4	>652	>25	>576	>26
09-45	-	-	>652	>25	>576	>26
09-46	-	-	>652	>25	>576	>26

* dose che causa il 50% dell'effetto ** Resistance index *** g a.i. ha^{-1} (errore standard)

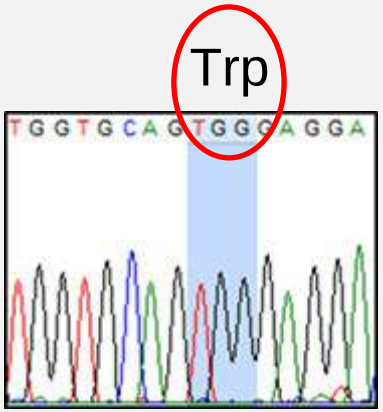
Basi molecolari della resistenza agli inibitori dell'ALS in *E. crus-galli*

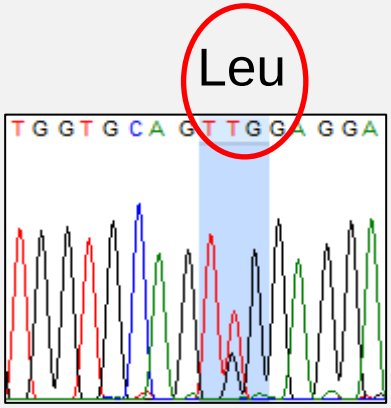
Acetolattato sintasi: enzima coinvolto nella biosintesi *de novo* degli aminoacidi a catena ramificata, valina, leucina e isoleucina.



Mutazione in posizione 574:

WT

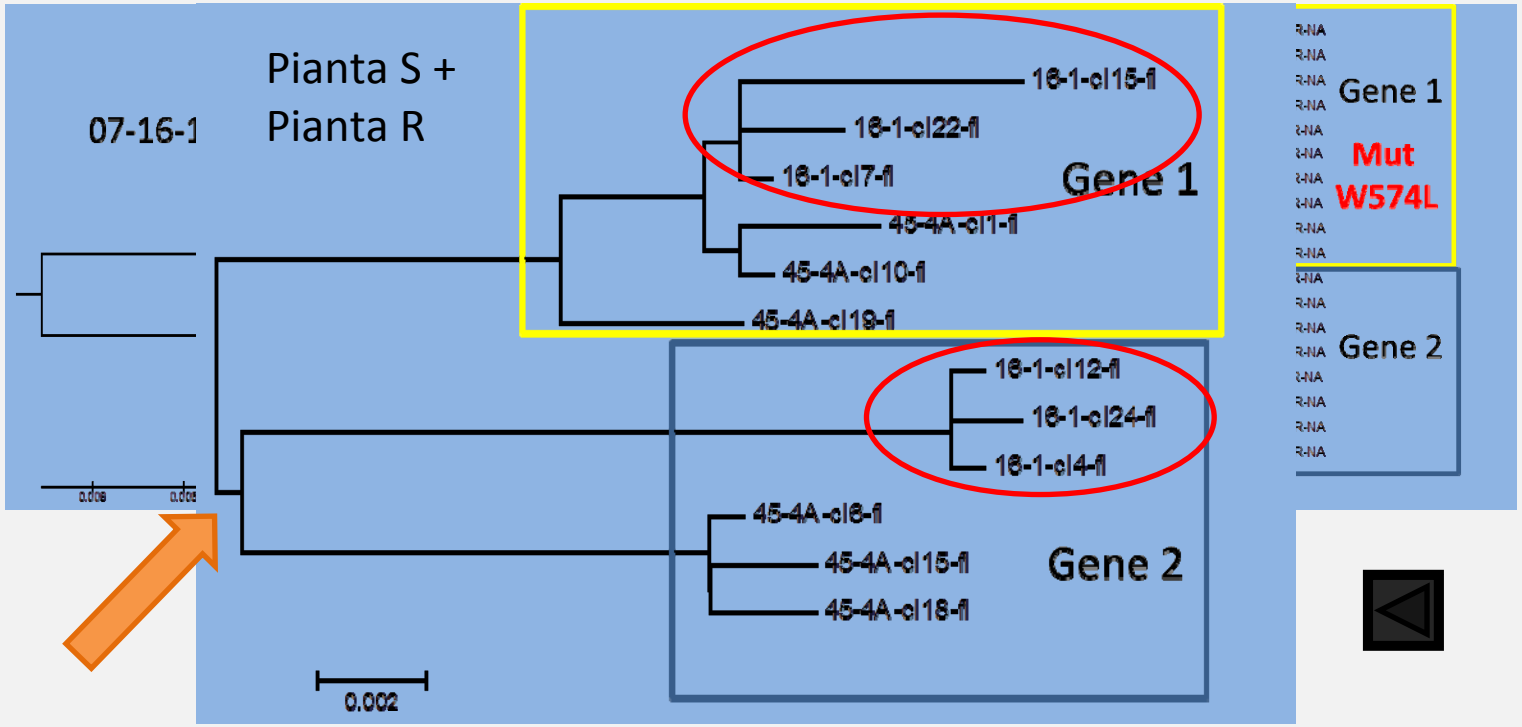




MUT

Causa cross-resistenza a tutte le famiglie di ALS con alti livelli di resistenza

Copie del gene ALS espresse nel genoma di *E. crus-galli*



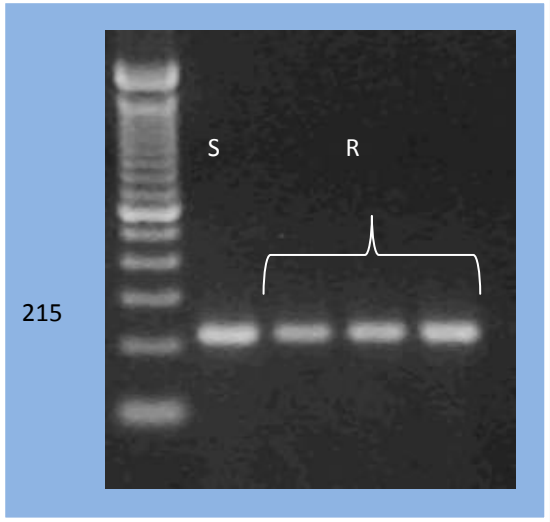
- 2 cluster identificati in tutte le piante analizzate
- La mutazione 574 è presente in tutte le pop analizzate nel Gene 1 (sia in omozigosi che in eterozigosi)

Marcatore molecolare

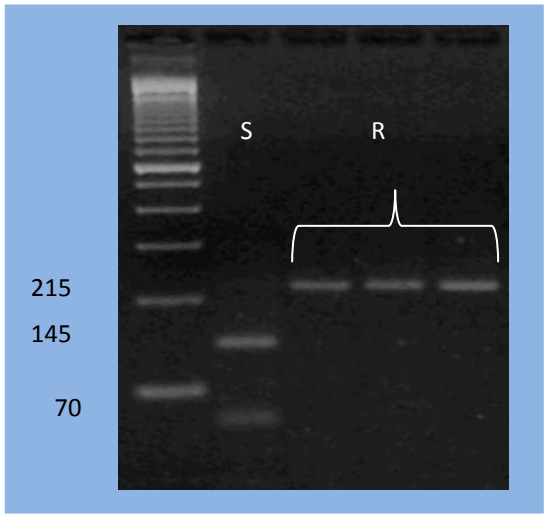
AS-CAPS = Allele Specific - Cleaved Amplified Polymorphic Sequences

Identificazione polimorfismi per distinguere Gene 1 da Gene 2

Costruzione primer gene-specifici sui polimorfismi 590 e 621



Identificazione di un sito di taglio per l'enzima BtsI in posizione 574



Validazione

Sostenibilità impiego erbicidi

In presenza di *Echinochloa spp.* resistenti agli erbicidi inibitori dell'ALS nella risaia:

- Intervenire con prodotti in pre-semina e pre-emergenza su infestanti in una fase sensibile del loro ciclo vitale
- Intervenire in post-emergenza con prodotti a base di profoxydim e/o cyhalofop butyl

Sostenibilità impiego erbicidi

In presenza di *Echinochloa spp*. con resistenza multipla agli inibitori dell'ALS e agli ACCasi in risaia

Gestione problematica; è **assolutamente** necessario adottare strade alternative al diserbo

Rotazione delle colture: **riso-mais** o **riso-soia**. Semina tardiva; interventi in pre-semina con prodotti aventi un diverso MdA.
In post-emergenza, l'unico prodotto disponibile in soia è il clomazone mentre in mais ci sono più prodotti disponibili

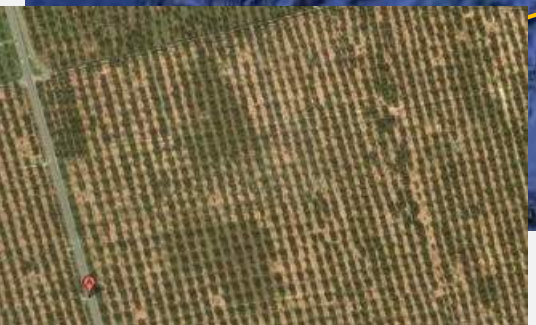
Tecniche agronomiche: **lavorazioni** del terreno per contenere le malerbe prima della semina e utilizzo di **varietà a ciclo più precoce**, ma diminuisce la resa

Linee guida specifiche per la gestione della resistenza in vari sistemi colturali

Attualmente disponibili per:
riso, cereali, colture
sarchiate ed erba medica

www.resistenzaerbicidi.it

Resistenza al glifosate in colture arboree



- 332 Vigneti dell'Astigiano
  > 300 ha infestati
  20 anni uso glifosate
  1-2 trattamenti all'anno

- 335, vicino al vigneto
  332, controllo meccanico

336 Oliveti del Leccese
migliaia di ha infestati
>20 anni uso glifosate
2-3 trattamenti
all'anno

Caratteristiche comuni:
Nessuna lavorazione
Uso intensivo di glifosate

Lolium resistente al glifosate

- Alta pressione di selezione esercitata dall'uso continuo di glifosate ha portato alla resistenza
- Negli oliveti:
  - attrezzatura per trattare spesso inadeguata
  - applicazioni spesso con alti volumi d'acqua (700- 1000 L/ha)

Attrezzatura inefficiente

Meccanismo di resistenza target-site

Mutazione in posizione 106 del gene EPSPS

204L: CCA proline (wt)

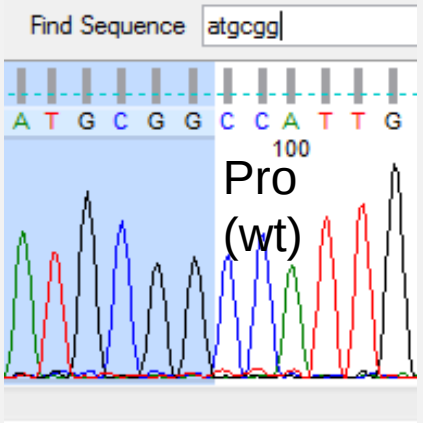
332: CCA proline (wt)

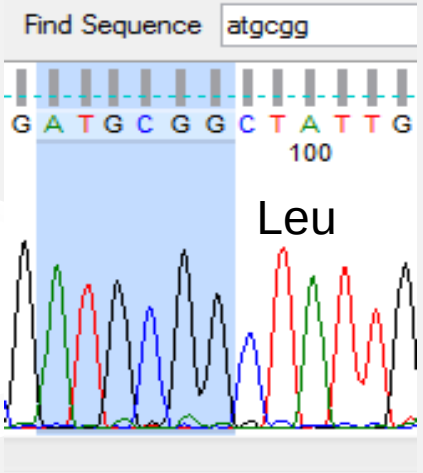
336: CCA-CTA Pro-Leu

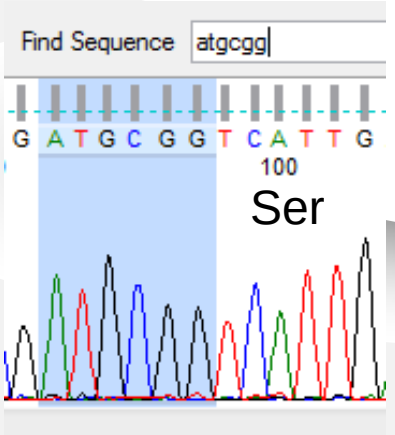
CCA-TCA Pro-Ser

CTA-TCA Leu-Ser

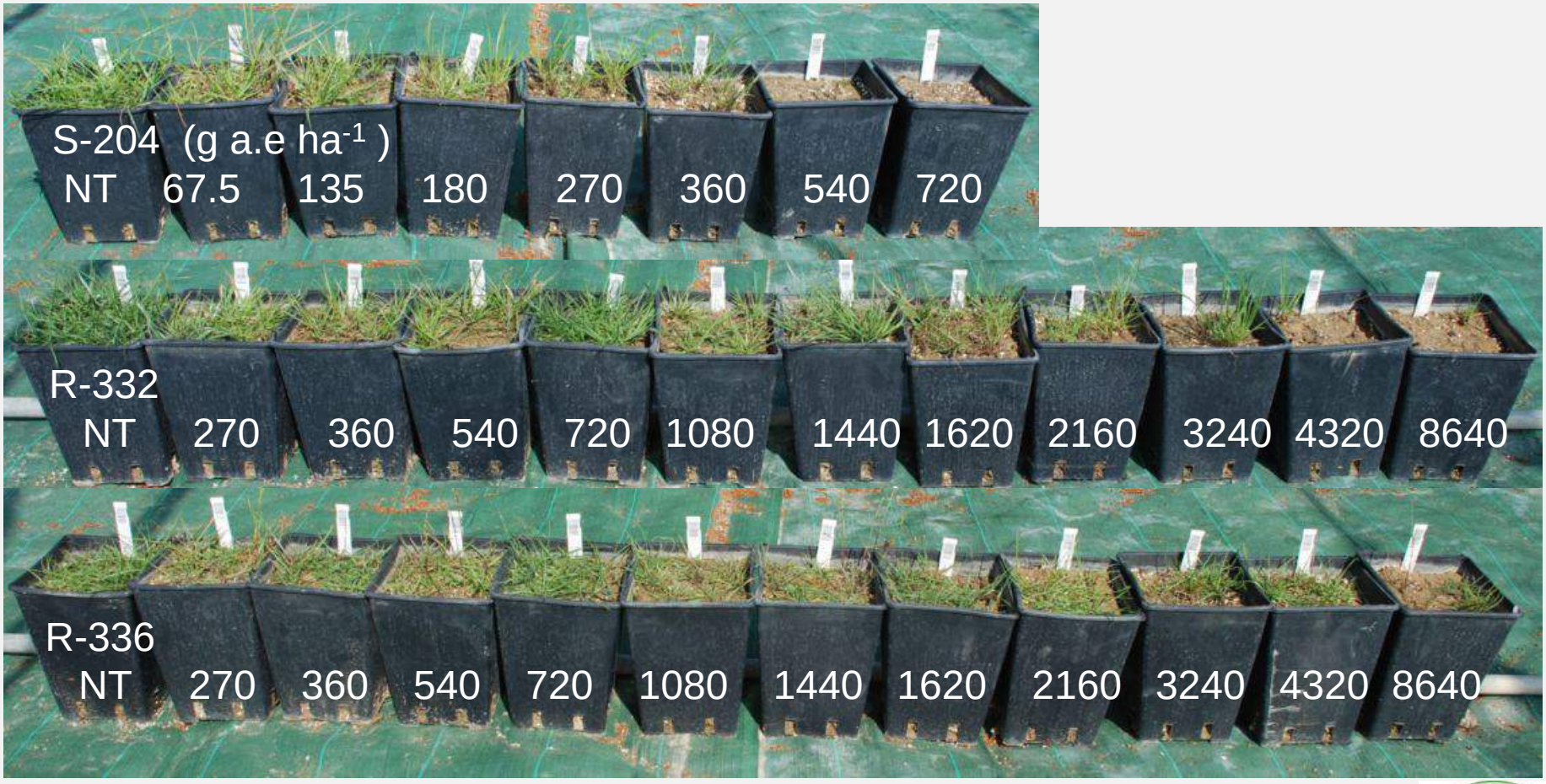
TCA-TCA Ser-Ser







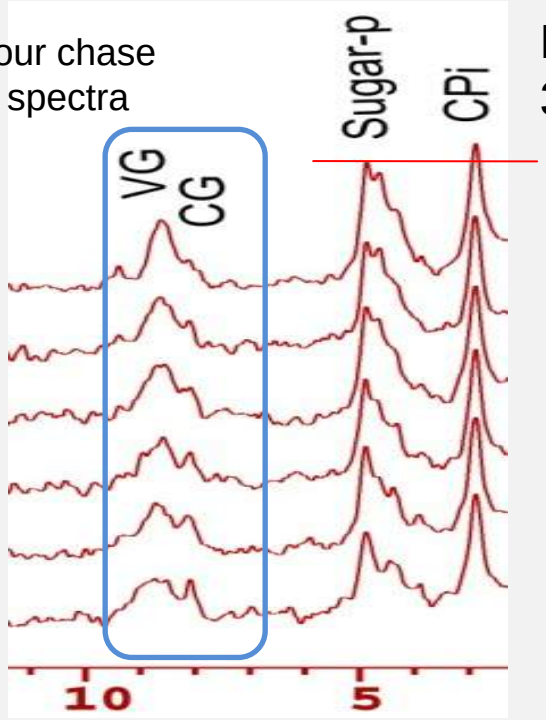
La mutazione determina un moderato livello di resistenza al glifosate (indice di resistenza < 5)



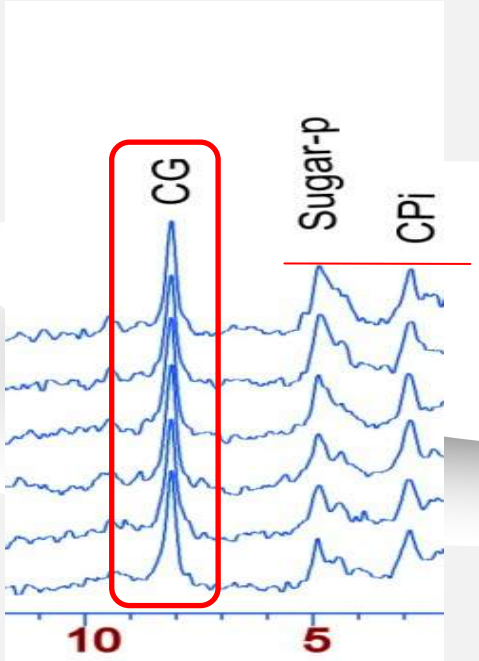
Collavo A. e Sattin M. 2012, Weed research 52, 16-24

NMR, esperimento PULSE-CHASE

14-24 hour chase period spectra



R 336



S 204

Le piante R accumulano glifosate nel vacuolo mentre diminuisce il glifosate nel citoplasma

Più veloce nella R336 che nel R332

Xia Ge et al 2012
Agric. Food. Chem 60, 1243-1250

Lolium spp. resistente

- Variabilità di meccanismi di resistenza
- Variabilità livelli di resistenza
- Finora no resistenza multipla (solo shifting con fluazifop)
- Attenzione al pollen flow
- Effetto delle condizioni climatiche al momento del trattamento: maggiore efficacia a basse t° (10° rispetto a 20°C)

Sostenibilità impiego erbicidi

- Inserire/preservare elementi di discontinuità temporale e spaziale
- Limitare le aree trattate (inerbimento interfila) Si riduce la pressione di selezione
- Utilizzo di miscele (prima di avere problemi di resistenza) per contrastare la comparsa di flora di sostituzione
- Rispettare le dosi
- Implementare il controllo meccanico

Diserbo sottofila

- In miscela con glifosate: flazasulfuron (inibitore dell'ALS)

  1 volta l'anno ogni 2 anni
- Carfentrazone (triazolinoni)
- Ciclossidim e fluazifop: graminicidi (inibitori ACCasi)

Considerazioni conclusive

- Maggiore consapevolezza del problema della resistenza perché non diventi un fattore limitante per l'agricoltura italiana
- È indispensabile ampliare o almeno mantenere il numero dei meccanismi d'azione utilizzabili
- Quale impatto ha la conoscenza delle basi della resistenza? Limitato sulla gestione e significativo sull'industria
- Occorre allineare tutti i consigli tecnici alle misure di gestione integrata e di prevenzione: diversificare gli interventi in campo (mezzi chimici e non) su larga scala

Considerazioni conclusive

- Necessità di integrare le conoscenze, approccio multisciplinare e diffusione in tutta la filiera; alcune semplici misure non sono state ancora implementate. Es. etichette
- Maggiore professionalità
- Non dimenticare che la resistenza è un costo; le misure curative con resistenza in atto comportano un costo medio superiore di 3-5 volte rispetto a quelle preventive

Grazie per l’attenzione