

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE *Cyperus iria* A INIBIDORES DA ALS

Filipi Mesquita Machado¹; Giovanna Simões Camba Silva²; Guilherme Menegol Turra³; Vinicius Ferrari Tasca⁴; Aldo Merotto Jr.⁵.

Palavras-chave: Mutação, Tiririca, Junquinho, Sequenciamento, lavoura arrozeira.

Introdução

Cyperus iria (junquinho) é uma planta daninha com grande ocorrência em áreas de produção de arroz irrigado. Sua importância vem crescendo na lavoura arrozeira devido ao recente aumento nos casos de resistência a herbicidas inibidores da ALS (acetolactase sintase). Estes casos de resistência estão relacionados ao aumento da pressão de seleção exercida pelo uso recorrente destes herbicidas. Isto ocorreu de forma mais acentuada a partir da adoção de cultivares de arroz do sistema de produção Clearfield®, resistentes ao grupo das Imidazolinonas (Ávila et al., 2021). A resistência aos inibidores da ALS nessa espécie foi recentemente caracterizada em trabalhos no Rio Grande do Sul e no mundo e atribuída a mutação Trp574Leu (Riar et al., 2015; Chiapinotto et al., 2022). Recentemente, *C. iria* foi caracterizado como diploide e com duas cópias do gene *ALS* (Yang et al., 2025). Existe a necessidade de conhecimento do mecanismo de resistência em maior número de populações de forma a auxiliar na tomada de decisão e contribuir com o manejo integrado. Os objetivos do presente trabalho foram identificar e caracterizar o mecanismo de resistência em populações de *Cyperus iria* resistentes aos inibidores da ALS e desenvolver marcadores moleculares para possibilitar o diagnóstico dos mecanismos de resistência de forma expedita em grande número de populações.

Material e Métodos

O material vegetal consistiu em 8 populações de *C. iria* que fazem parte do banco de sementes do Grupo Universitário de Investigações em Herbologia (GUIHE) que tiveram seu padrão de resistência caracterizado através de curvas de dose-resposta em estudos anteriores. A extração de DNA de amostras de tecido vegetal ocorreu através do protocolo com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). O desenho dos primers foi realizado baseado no genoma de *Cyperus iria* (Yang et al., 2025). Foram desenhados primers visando a cobertura de todo o gene *ALS* com foco nas principais posições conhecidas relacionadas com a resistência a herbicidas - Ala122, Pro197, Ala205, Phe206, Asp376, Arg377, Trp574, Ser653 e Gly654 (Figura 1). Foram utilizados dois pares de primers, sendo um para as posições iniciais do gene, e outro para as regiões finais. Também foram desenhados primers específicos para cada cópia do gene a partir de *SNPs* entre as duas cópias visando a região da posição Trp574 de *C. iria*.

As reações de PCR convencional foram conduzidas em termociclador (Bio-Rad c1000) e compostas por uma etapa inicial de desnaturação de 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 62°C por 30s e 72°C por 3 minutos e 30s, com uma etapa final de

¹ Estudante de graduação em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, filipimesqmach@gmail.com.

² Estudante de graduação em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, gi.simoies@outlook.com.

³ Doutorando em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, turragn@gmail.com.

⁴ Estudante de graduação em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, viniciustasca210900@gmail.com.

⁵ Professor, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, aldo.merotto@ufrgs.br

extensão de 72°C por 5min. As amostras foram verificadas com gel de agarose a 1,5%. Por fim, marcadores moleculares SNAP para a mutação Trp574Leu foram desenvolvidos e validados para a amplificação em qPCR. Os marcadores moleculares foram desenvolvidos de acordo com a metodologia descrita em Roso et al. 2010. As populações 2 e 3 foram utilizadas como controle positivo e as populações 6 e 7, e reações sem adição de DNA, foram utilizadas como controle negativo. As amplificações foram realizadas utilizando equipamento qRT-PCR QuantStudio™ 3 e reação otimizada com o protocolo padrão de PowerUp™ Sybr Green Master Mix. Outras 22 populações, coletadas de regiões de lavouras arrozeiras do Rio Grande do Sul após relatos de escape de controle de inibidores da ALS foram genotipadas com os marcadores moleculares para a presença da mutação Trp574Leu.

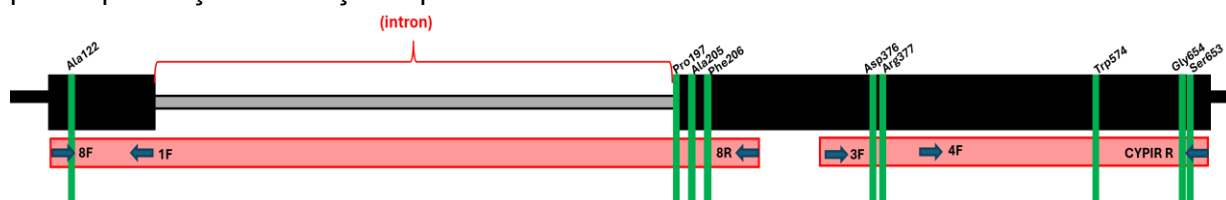


Figura 1. Gene ALS de *Cyperus iria* com as posições conhecidas de ocorrência de mutação e os primers utilizados.

Resultados e Discussão

Os estudos com *C. iria* relacionados com o sequenciamento de DNA apontam a ocorrência de resistência relacionada ao local de ação em ao menos 3 destas populações iniciais. As populações 2 e 3 apresentaram a substituição de Triptofano (TGG) para Leucina (TTG), caracterizando a mutação Trp574Leu (Figura 2). Esta mutação é conhecida e já foi relatada em outros estudos realizados no RS (Chiapinotto et al., 2022) e nos estados do Arkansas e Mississippi dos EUA (Riar et al., 2015). A presença de picos duplos no sequenciamento indica que apenas uma das cópias apresenta mutação. A população 7 apresentou dois picos duplos no códon que codifica para triptofano (TGG), não sendo possível a caracterização da mutação no primeiro sequenciamento. Para a população 8 o seu mecanismo de resistência ainda não foi totalmente comprovado. Nesta população não foi encontrada mutação na posição Trp574 como as demais. Contudo, ainda se faz necessário o sequenciamento para as posições iniciais Pro197, Ala205, Phe206, Asp376, Arg377 para esta população.

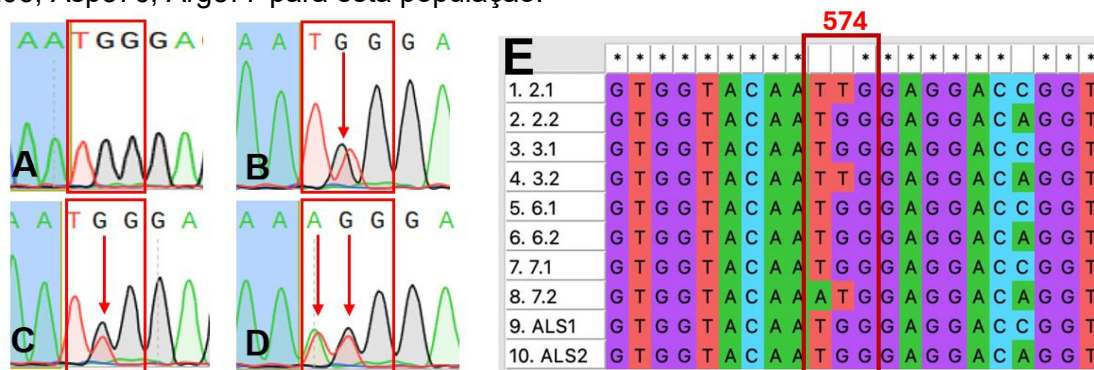


Figura 1. Eletroferograma indicando a composição nucleotídica da posição 574 do gene ALS. **A)** População 6 suscetível (*wild-type*); **B)** População 2 com o pico duplo indicando a mutação Trp574Leu; **C)** População 3 com o pico duplo indicando a mutação Trp574Leu; **D)** População 7 com dois picos duplos no códon da posição Trp574; **E)** Sequência nucleotídica das cópias 1 e 2 do gene ALS das populações 2, 3, 6 e 7. A região destacada é a posição 574.

A utilização de primers específicos para cada uma das cópias de *ALS* demonstrou que a cópia 2 apresenta a substituição do Triptofano (TGG) por uma Metionina (ATG). A mutação Trp574Met já foi reportada em outras espécies daninhas (Turra et al., 2023), mas esse é o primeiro relato dessa substituição em *C. iria*. Ainda, a avaliação dos primers específicos para cópias individuais identificou que a mutação na população 2 encontra-se na cópia 1, ao passo que nas populações 3 e 7 as mutações são observadas na cópia 2 do gene (Figura 2E).

Os resultados obtidos através do sequenciamento de DNA indicam que a resistência a herbicidas inibidores da ALS em *C. iria* ocorre predominantemente devido a mutação na posição Trp574 do gene ALS. Desta forma, foi desenhado marcador molecular SNAP específico para esta mutação de forma a proporcionar a rápida identificação de sua ocorrência em maior número de plantas. O marcador molecular SNAP para a mutação Trp574Leu foi validado em amostras de DNA das populações 2 e 3 cujo sequenciamento *Sanger* indicou a ocorrência da referida mutação (Figura 2a). Para a população 7 que possui a mutação Trp574Met não houve amplificação, o que comprova a especificidade do marcador (Figura 2a). Além disso, os marcadores também não amplificaram para a população suscetível (sem mutação).

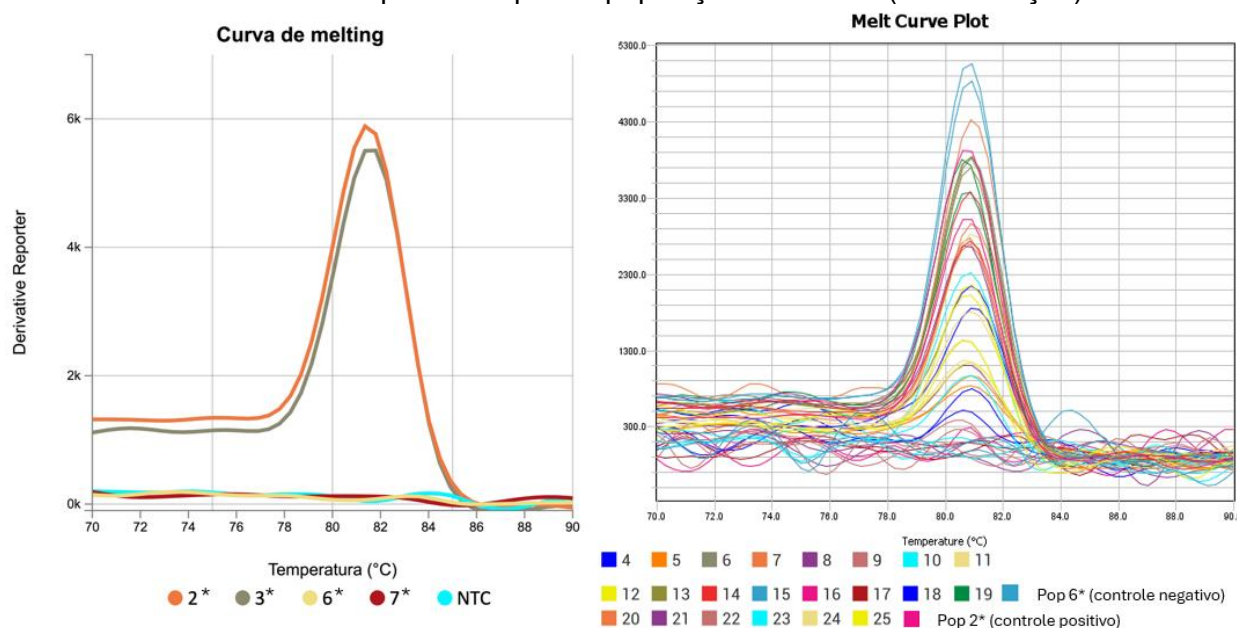


Figura 2. A) Curvas de melting obtidas em RT-qPCR com destaque para as populações 2 e 3 resistentes devido a mutação Trp574Leu, população 7 devido a mutação Trp574Met, e população 6 suscetível; B) Curvas de melting obtidas em RT-qPCR indicando as 15 populações que amplificaram para os marcadores moleculares da mutação Trp574Leu.

A avaliação do mecanismo de resistência em 22 populações coletadas a campo na safra 2024/25 indicou a ocorrência da mutação Trp574Leu em 15 destas amostras (Figura 2b). Nos resultados observou-se a amplificação de 15 amostras utilizadas e dos controles-positivos. As amostras controle-negativo não amplificaram, conforme esperado. (Figura 2b). Outras 7 populações não apresentaram amplificação para o marcador SNAP Trp574Leu. Isto pode ser explicado pela ocorrência de suscetibilidade destas populações, pela resistência através de outra mutação no gene ALS, ou devido a outro mecanismo de resistência. Os resultados indicam que resistência aos inibidores da ALS nessas populações é por mutação da enzima alvo através da substituição Trp574Leu. A presença da mutação Trp574Leu não impede que outras mutações também estejam presentes em alguma dessas populações. Das 30 populações analisadas, 20

apresentam resistência, e destas 17 apresentam a mutação Trp574Leu. Apenas a população 7 do estudo inicial apresenta a mutação Trp574Met.

Conclusões

A causa da resistência a herbicidas inibidores da ALS em *C. iria* em 17 de 30 populações avaliadas está associada a mutação Trp574Leu. Em uma única população foi encontrada a mutação Trp574Met. Isto indica baixa variabilidade da resistência a herbicidas inibidores da ALS nesta espécie. A mutação na posição 574 já havia sido relatada previamente em *Cyperus iria* em outros estudos no Brasil e EUA. O presente estudo proporcionou resultados em maior número de populações. Além disso, foi desenvolvido marcador molecular para a identificação de resistência associada a mutação Trp574Leu em *C. iria*. Isto possibilita um rápido diagnóstico do mecanismo de resistência a partir de amostras de tecido vegetal, como de plantas oriundas de escape de aplicação de herbicidas.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq bolsa de Iniciação Científica a FMM e pela bolsa de produtividade de pesquisa a AMJ. E à CAPES pela bolsa de doutorado para GMT.

Referências

- AVILA, L. A. de. *et al.*, "Eighteen years of Clearfield™ rice in Brazil: what have we learned?" *Weed Science*, vol. 69, no. 5, p. 585–597, 2021. Disponível em: https://www.cambridge.org/core/journals/weed-science/article/abs/eighteen-years-of-clearfield-rice-in-brazil-what-have-we-learned/2D2C2A66B7B1E11E8621AA516612CFEA?utm_campaign=shareaholic&utm_medium=copy_link&utm_source=bookmark. Acesso em: 22 mai. 2025.
- CHIAPINOTTO, D. M. *et al.* Target-site is the main mechanism of resistance to ALS-inhibitor herbicides in a rice flatsedge population from Southern Brazil. *Advances in Weed Science*, v. 41, e020220066, 2023. Disponível em: <http://awsjournal.org>. Acesso em: 20 mai. 2025.
- GAINES, T. A. *et al.* Mechanisms of evolved herbicide resistance. *Journal of Biological Chemistry*, v. 295, n. 30, p. 10307–10330, 2020. Disponível em: [www.jbc.org/article/S0021-9258\(17\)50140-4/fulltext](http://www.jbc.org/article/S0021-9258(17)50140-4/fulltext). Acesso em: 25 mai. 2025.
- RIAR, D. S. *et al.* Acetolactate synthase-inhibiting, herbicide-resistant rice flatsedge (*Cyperus iria*): Cross-resistance and molecular mechanism of resistance. *Weed Science*, v. 63, n. 4, p. 748–757, 2015. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/full/10.1614/WS-D-15-00014.1>. Acesso em: 23 mai. 2025.
- ROSO, A. C. *et al.* Regional scale distribution of imidazolinone herbicide-resistant alleles in red rice (*Oryza sativa* L.) determined through SNP markers. *Field Crops Research*, v. 119, n. 2, p. 175–182, out. 2010.
- TURRA, G. M. *et al.* Application of ALS inhibitors at pre-emergence is effective in controlling resistant barnyardgrass biotypes depending on the mechanism of resistance. *Crop protection*, v.172, 2023.
- YANG, Siyu *et al.* Chromosome-level genome assembly of *Cyperus iria*, an aggressive weed of rice. *Scientific Data*, v. 12, n. 1, p. 120, 21 jan. 2025.