

# Monitoraggio e determinazione delle specie di amaranto resistente agli erbicidi ALS in Friuli Venezia Giulia

Maurizio Sattin, Laura Scarabel, Andrea Milani

Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP) – CNR

Renato Danielis, Gaia Dorigo

Servizio fitosanitario e chimico, ricerca, sperimentazione e assistenza tecnica

L'aumento delle superfici coltivate a soia a cui si è assistito dopo gli anni '80 in regione, legato ad una strategia di controllo delle infestanti basata principalmente sull'utilizzo di erbicidi di post-emergenza, ha portato alla diffusione su tutto il territorio di popolazioni di amaranto resistente ad alcune sostanze attive. Fin dalla comparsa dei primi individui il sospetto è ricaduto sugli erbicidi inibitori della acetolattato sintasi (ALS).

Nel 2019, ERSA e l'Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP) – CNR hanno siglato la convenzione per il progetto di ricerca "Monitoraggio e determinazione delle specie di amaranto resistente agli erbicidi ALS in Friuli Venezia Giulia" al fine di studiare il fenomeno e, in particolare, verificare l'effettiva resistenza a questa classe di erbicidi, determinare quali specie sviluppino più frequentemente la resistenza e testare l'efficacia di tre sostanze attive usate in pre-emergenza su alcune delle popolazioni risultate effettivamente resistenti agli erbicidi ALS. A livello globale, l'amaranto è una delle malerbe maggiormente diffuse e più problematiche tra quelle che invadono le colture estive.

Si tratta di un genere molto complesso che include una settantina di specie, di cui 24 presenti anche in Italia. Tutte le specie di amaranto hanno metabolismo C4 ed hanno crescita molto rapida durante i mesi estivi anche se asciutti. Una quarantina di specie sono originarie delle Americhe, le restanti provengono dagli altri continenti. Solo tre specie di amaranto sono riconosciute come native del continente europeo: *Amaranthus blitum*, *A. bouchonii* ed *A. graecizans*.

Tutte le altre sono considerate neofite, ovvero "alloctone" o "aliene", introdotte da un'altra regione geografica dopo la scoperta dell'America. A livello globale, *A. retroflexus*, *A. hybridus*, *A. bouchonii* ed *A. powellii* sono fra le specie monoiche più diffuse in ambiente agricolo. Tra queste, biotipi resistenti agli inibitori di ALS sono già stati segnalati in passato e rappresentano una seria minaccia per la produttività delle colture estive.

In Friuli Venezia Giulia, oltre alle tre specie native già citate (*A. blitum*, *A. bouchonii* ed *A. graecizans*), risultano presenti otto specie definite "aliene casuali", ovvero formanti popolazioni esigue e non stabili: *A. caudatus*, *A. cruentus*, *A. hypochondriacus*, *A. spinosus*, *A. tricolor*, *A. tuberculatus* ed *A. viridis*.

Vi sono poi cinque specie naturalizzate, ovvero formanti popolazioni stabili, ma che non costituiscono un rischio per la flora autoctona: *A. albus*, *A. blitoides*, *A. deflexus*, *A. hybridus*, *A. powellii*.

L'unica specie di amaranto attualmente riconosciuta in bibliografia come aliena invasiva, ovvero formante popolazioni enormi e che costituiscono un rischio per la flora autoctona e le specie coltivate, è *A. retroflexus*.

**Verifica dell'effettiva resistenza agli erbicidi ALS delle popolazioni di amaranto campionate in FVG**

Materiale e metodi:

Nel corso del 2018 i tecnici ERSA hanno individuato sull'intero territorio regionale 57 appezza-

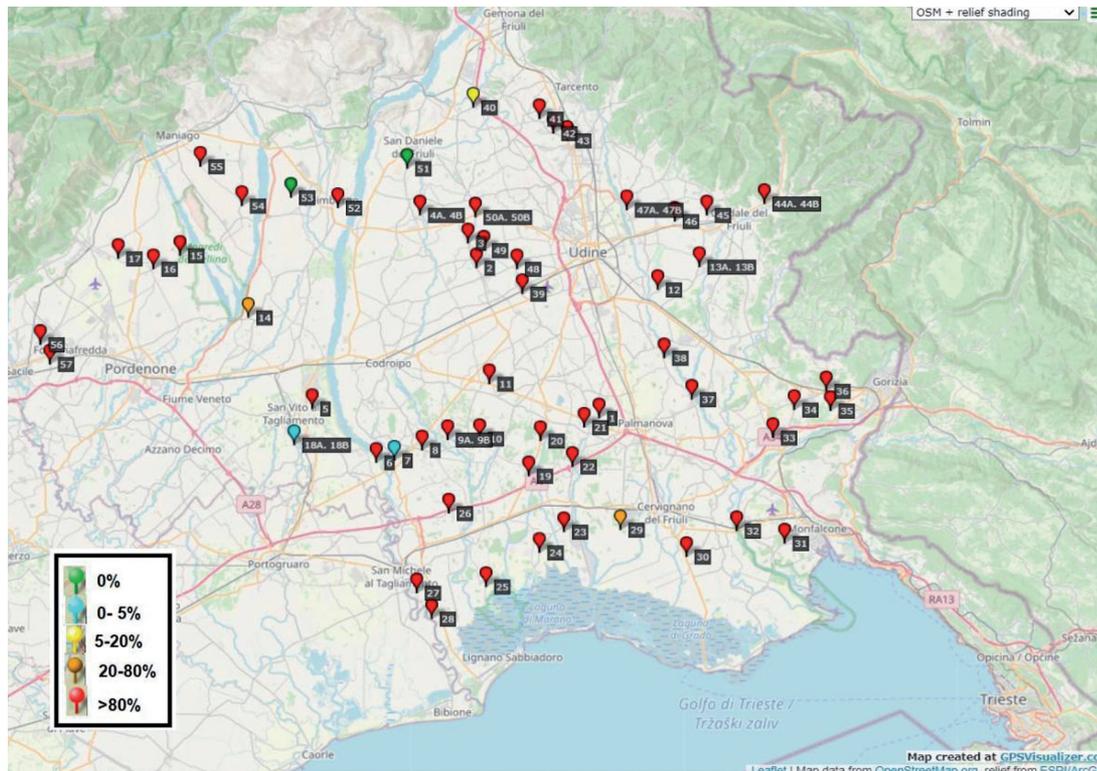


Figura 1: Posizione geografica delle popolazioni campionate e relativo status di resistenza ad imazamox e tifensulfuron-metile. Le percentuali in legenda indicano la media delle piante sopravvissute (resistenti) alla dose di campo dei due erbicidi.

menti con forte presenza di amaranto come unica infestante, situazione che lasciava presagire la presenza di individui resistenti agli erbicidi impiegati.

Per ogni appezzamento scelto sono stati prelevati dei campioni, la cui semente è stata utilizzata per la successiva fase sperimentale. In totale il gruppo di ricerca Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP) – CNR ha analizzato 57 popolazioni presunte resistenti agli ALS, confrontate con 3 popolazioni usate come *check* suscettibili, una per ciascuna delle principali specie infestanti (*A. retroflexus*, *A. hybridus*, *A. bouchonii*).

I semi di ogni popolazione sono stati vernalizzati per 7 giorni a 4 °C per stimolare la germinazione e quindi seminati in scatole di plastica trasparente sul cui fondo era presente agar (0,6%). Successivamente le scatole sono state poste in germinatoio in condizioni di alternanza di temperatura e di luce/buio (12h luce a 27 °C / 12h buio a 17 °C) per 6 giorni.

Le plantule sono state trapiantate in vaschette (24 cm x 30 cm x 9 cm) con substrato così composto: 60% terreno argilloso-limoso, 15% sabbia, 15% perlite e 10% torba.

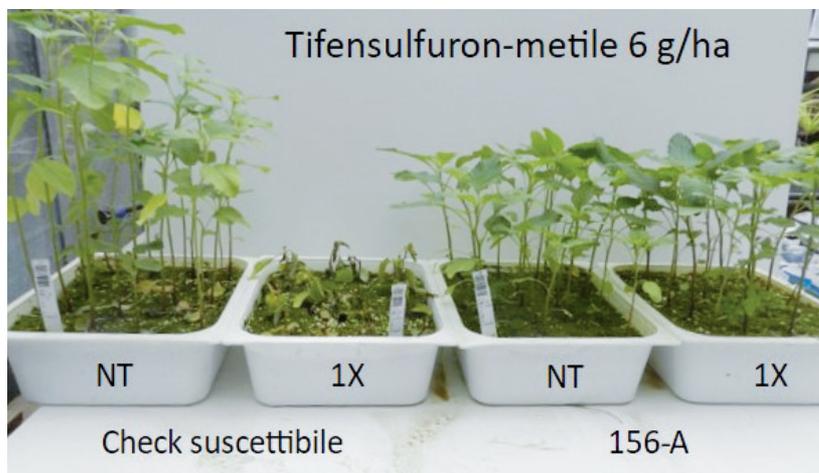
Per ogni popolazione sono state previste due repliche (ovvero due vaschette da 20 piante ciascuna) per ognuno dei due erbicidi in prova, più un testimone non trattato.

Quando le piante hanno raggiunto la dimensione ottimale di 2-4 foglie vere (stadio BBCH 12-14), è stato eseguito un trattamento alla dose di campo con i due erbicidi ALS separatamente:

- tifensulfuron-metile 6 g s.a./ha, in miscela allo 0,1% con bagnante alcool isodecilico etossilato 900 g/l;
- imazamox 40 g s.a./ha

I trattamenti sono stati eseguiti con un banco irroratore ad alta precisione equipaggiato con una barra a 3 ugelli a ventaglio con angolo di apertura 110° e foro di 0,2 mm, con una portata di 300 l/ha, una pressione di esercizio di 215 KPa (circa 2,1 atm) ed una velocità della barra di 0,75 m/s.

Figura 2: Nelle prime due vaschette a sinistra è stato seminato il *check* suscettibile, la terza e la quarta vaschetta contengono una delle popolazioni resistenti agli ALS. (NT = testimone non trattato, 1X = campione trattato con tifensulfuron-metile alla dose di campo)



Le irrigazioni sono riprese 24 ore dopo il trattamento erbicida.

I sopravvissuti e la stima visiva della biomassa (VEB) sono stati rilevati a tre settimane dal trattamento erbicida, quando i *check* suscettibili erano completamente controllati.

Tutte le popolazioni sono state seminate, trapianate, trattate e analizzate contemporaneamente. L'esperimento è stato condotto in serra per garantire uniformità di risposta.

### Risultati

La stragrande maggioranza delle popolazioni presenta una percentuale di piante resistenti superiore all'80%. La sopravvivenza a imazamox e quella a tifensulfuron-metile sono uguali, si tratta quindi di una *cross-resistenza* (o resistenza incrociata) per cui un singolo meccanismo di resistenza conferisce resistenza a diversi erbicidi. La stima visiva della biomassa (VEB) dei sopravvissuti è uguale a quella dei testimoni non trattati in tutti i casi, ovvero le piante sopravvissute al trattamento non hanno subito danni pregiudicanti lo sviluppo e sono di dimensioni simili a quelle del testimone non trattato.

### Riconoscimento delle specie

Fra giugno e ottobre, le piante sopravvissute alle dosi di campo di tifensulfuron-metile sono state portate a fioritura.

Per determinare le specie di amaranto coinvolte è stata utilizzata la chiave botanica semplificata

descritta dal gruppo di ricerca Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP) – CNR (Milani, A., Scarabel, L., Sattin, M. 2020. *A family affair: resistance mechanism and alternative control of three Amaranthus species resistant to acetolactate synthase inhibitors in Italy*; Pest Management Science, 76(4), 1205–1213; <https://doi.org/10.1002/ps.5667>).

### Materiali e metodi

Una vaschetta utilizzata per l'esperimento precedente (*screening ALS*) per ciascuna delle 53 popolazioni sopravvissute alla dose di campo di tifensulfuron-metile è stata conservata e le piante sono state cresciute fino alla fioritura.

Man mano che le popolazioni raggiungevano la maturazione completa, le cime fiorite di 10-15 piante per vaschetta sono state raccolte ed essiccate in buste di carta.

L'infiorescenza di ciascuna pianta è stata osservata con microscopio binoculare e con microscopio digitale al fine di determinare la specie di appartenenza utilizzando la chiave botanica citata.

### Risultati

Tutte le piante campionate erano monoiche, ovvero avevano sia fiori femminili (con seme) che fiori maschili (antere con abbondante polline). Nessuna pianta presentava spine in corrispondenza dei nodi. L'apice dei tepali dei fiori aveva forma acuta in tutti i casi. Queste caratteristiche hanno escluso gli amaranti dioici (*A. tuberculatus*

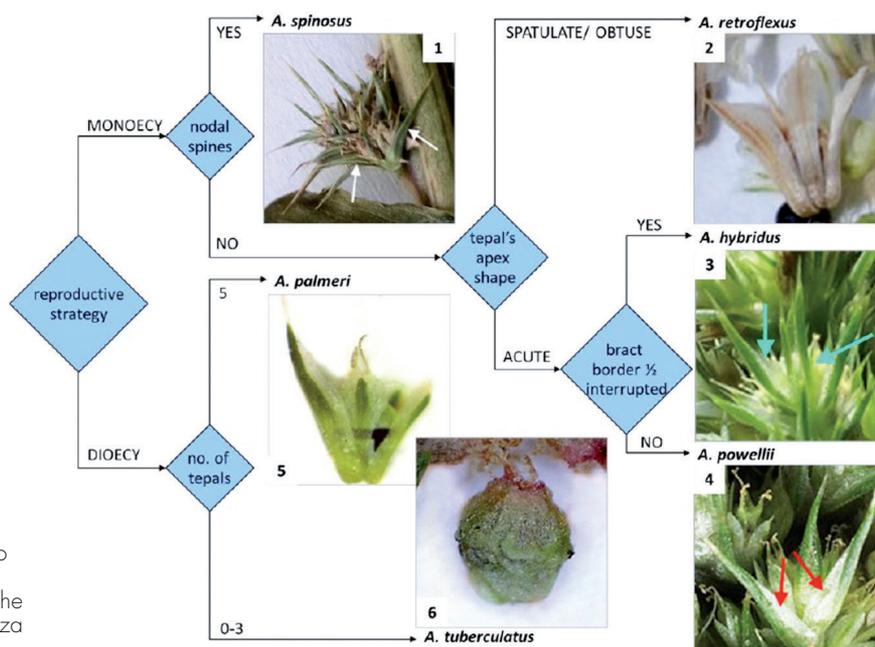


Figura 3: Chiave botanica semplificata per il riconoscimento delle sei specie di amaranto maggiormente diffuse nelle colture estive e che hanno evoluto resistenza nel mondo.

tus ed *A. palmeri*) ed alcune specie monoiche (*A. spinosus* ed *A. retroflexus*). Per distinguere *A. hybridus* ed *A. powellii* è necessario l'utilizzo di una lente, di un microscopio binoculare o di uno digitale.

Osservando attentamente le brattee fiorali è stato escluso *A. powellii*, in quanto erano assenti i bordi membranosi estesi fino all'apice della brattea. Tutte le popolazioni appartengono quindi alla specie *A. hybridus*.

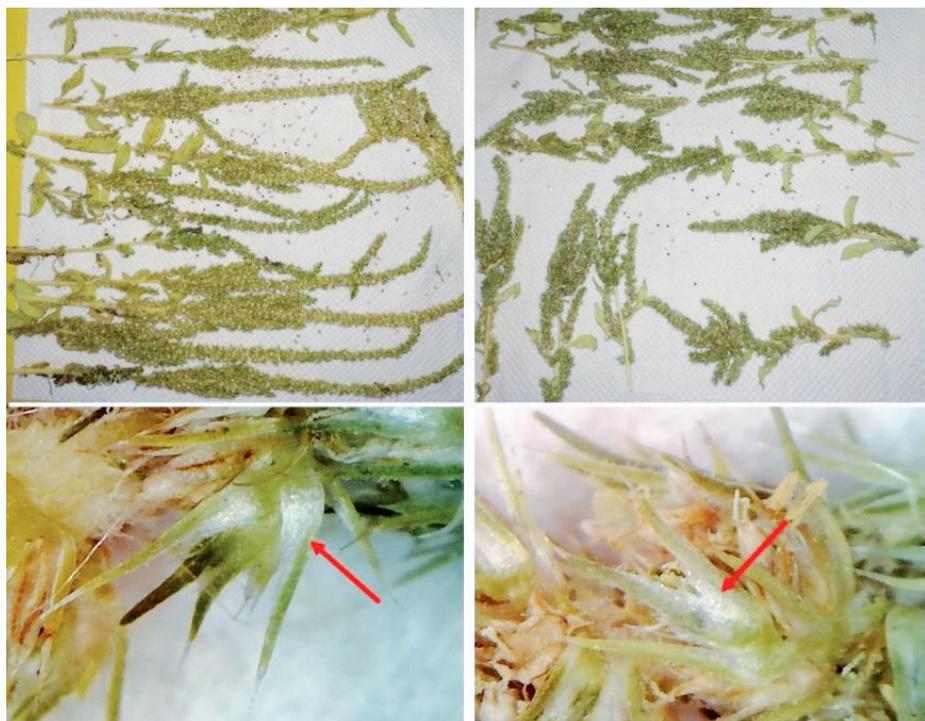
È interessante notare come la forma dell'infiorescenza possa risultare molto diversa fra popolazioni appartenenti alla stessa specie. In molti casi l'erbicida ha danneggiato la regione del meristema apicale, rallentando la crescita della pianta e causando la proliferazione di infiorescenze laterali. Anche per questo motivo non è possibile determinare a che specie appartenga un campione basandosi esclusivamente sulla forma delle infiorescenze, ma è necessario scendere nel dettaglio del singolo fiore.

### Screening con erbicidi non-ALS in pre-emergenza

Essendo stata trovata una sola specie nella fase precedente, si è deciso di testare l'applicazione di erbicidi non-ALS in pre-emergenza su altre 6 popolazioni distribuite sul territorio, più una popolazione usata come *check* suscettibile.

#### Materiali e metodi

I semi di ogni popolazione sono stati vernalizzati per 3 giorni a 4 °C per stimolare la germinazione e sono stati depositi in scatole di plastica trasparente sul cui fondo era presente carta inumidita. Successivamente le scatole sono state poste in germinatoi per 24 ore in condizioni di alternanza di temperatura e di luce/buio (12h luce a 27 °C / 12h buio a 17 °C). Per ogni popolazione sono state previste tre repliche per ciascun erbicida, più il testimone non trattato, quindi 50 semi imbibiti sono stati seminati in vaschette (24 cm x 30 cm x 9 cm) con substrato composto da 60% di terreno argilloso-limoso, 15% di sabbia, 15% di perlite e 10% di torba. Lo strato superiore (3 cm) era composto di solo terreno argilloso-limoso sterilizzato (3 giorni a 105 °C) e lo stesso terreno è stato utilizzato per ricoprire leggermente la semente. Le vaschette sono state portate alla massima capacità di campo prima del trattamento



A 24 ore dalla semina è stato eseguito un trattamento alla dose di campo con tre erbicidi, separatamente:

- metribuzin 245 g s.a./ha
- clomazone 144 g s.a./ha
- metobromuron 1500 g s.a./ha

I trattamenti sono stati eseguiti con un banco irroratore ad alta precisione equipaggiato con una barra a 3 ugelli a ventaglio con angolo di apertura 110° e foro 0,2 mm, con una portata di 300 l/ha, una pressione di esercizio di 215 KPa (circa 2,1 atm) ed una velocità della barra di 0,75 m/s.

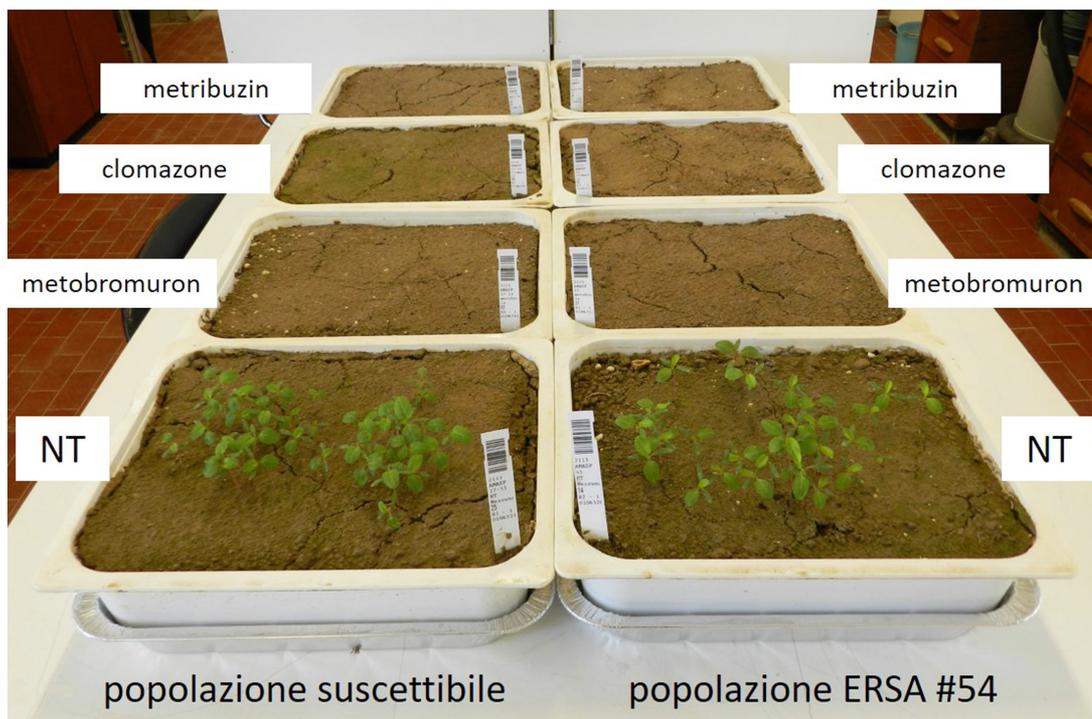
Le irrigazioni sono riprese 24 ore dopo il trattamento erbicida. I sopravvissuti e la stima visiva della biomassa (VEB) sono stati rilevati a due settimane dal trattamento erbicida, quando i testimoni non trattati avevano raggiunto la germinazione attesa. Tutte le popolazioni sono state trattate ed analizzate contemporaneamente. L'esperimento è stato condotto in serra per garantire uniformità di risposta.

#### Risultati

Tutti gli erbicidi testati hanno mostrato una elevatissima efficacia alle dosi impiegate. Solo nel caso di una popolazione sono stati osservati dei sopravvissuti al clomazone. Nonostante ciò, il peso fresco di queste plantule era minimo se comparato al non-trattato.

Figura 4: Infiorescenze (sopra) e dettaglio del fiore (sotto) di due popolazioni. Nonostante la struttura dell'infiorescenza sia diversa (più affusolata e lunga a sinistra, più corta e tozza a destra), le brattee del fiore sono identiche. In entrambi i casi la membrana si interrompe a circa metà della brattea (indicata dalla freccia rossa).

Figura 5:  
Risultati del test con erbicidi di pre-emergenza su una delle popolazioni resistenti agli ALS e confronto con *check* suscettibile.



### Studio del meccanismo di resistenza

Al fine di fornire alcune informazioni aggiuntive e di poter valutare eventuali azioni future, si è deciso di studiare il meccanismo di resistenza presente in 6 popolazioni provenienti da diverse aree della regione.

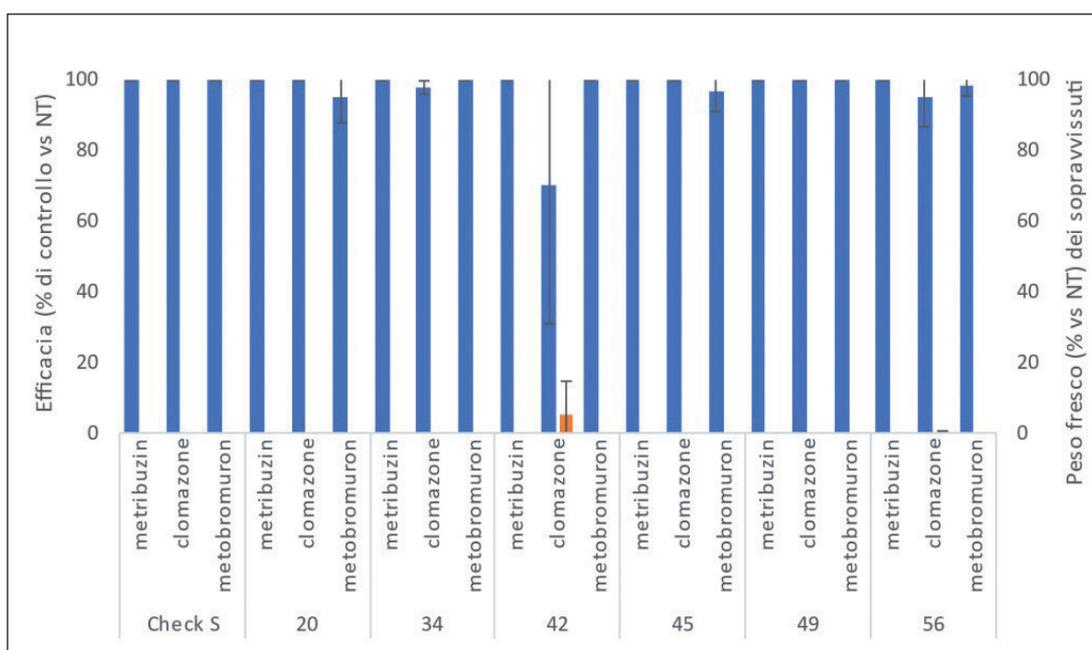
Quindi è stato fatto un sequenziamento parziale del gene ALS, per determinare se fosse o meno presente la mutazione in posizione 574 del gene, conosciuta come causa della resistenza a questa classe di erbicidi. Per accorciare i tempi

è stato messo a punto un protocollo di estrazione del DNA direttamente dai singoli semi di amaranto del campione originale, piuttosto che da plantule.

### Materiale e metodi:

1. Macinazione del materiale ed estrazione di DNA da singolo seme con protocollo CTAB
  2. Amplificazione e sequenziamento Sanger
- reazione di PCR: volume 25  $\mu$ l, 5  $\mu$ l di 5X Green GoTaq Flexi Buffer, mix dNTPs (0,2

Figura 6:  
Efficacia degli erbicidi metribuzin, clomazone e metobromuron sulle sei popolazioni testate (popolazioni n. 20, 34, 42, 45, 49 e 56) + *check* suscettibile. Le barre blu descrivono il controllo ottenuto, mentre quelle arancioni il peso fresco degli eventuali sopravvissuti (espressi come percentuali rispetto ai testimoni non-trattati)



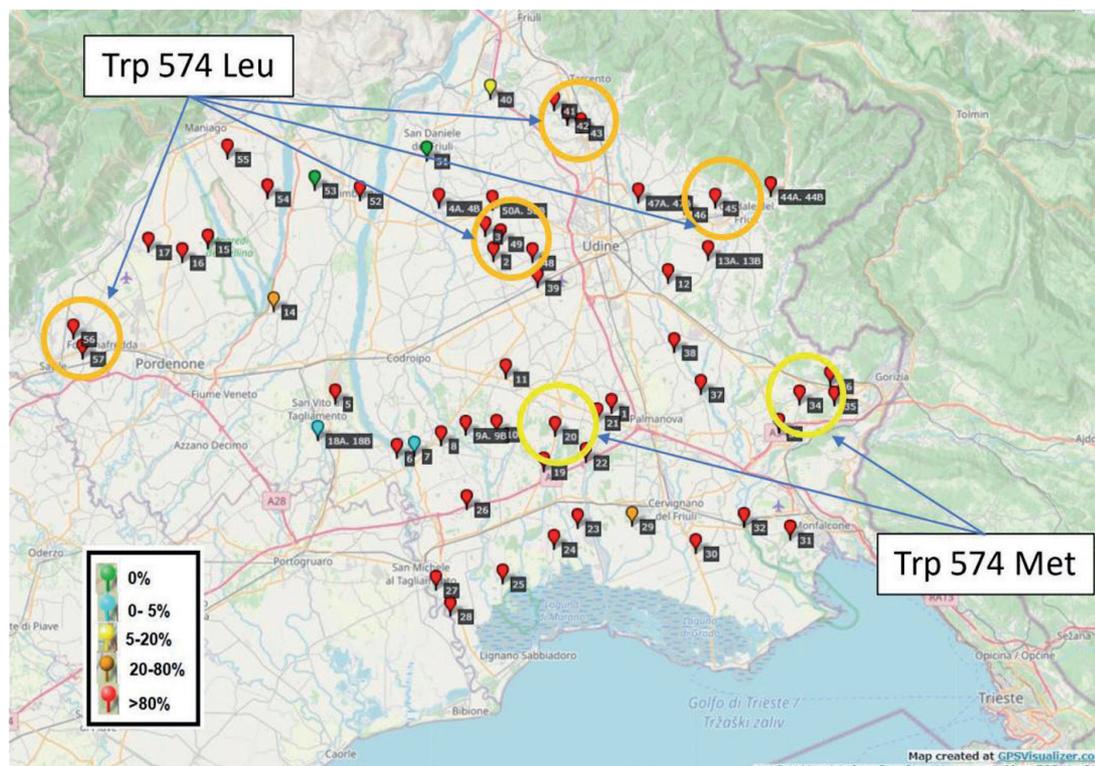


Figura 7: Mappa dell'ubicazione delle popolazioni di cui è stato parzialmente sequenziato il gene ALS. Alcune popolazioni hanno la sostituzione Trp 574 Leu, altre la Trp 574 Met.

mM ciascuno), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), forward e reverse primer (0,2 μM), 0,125 μl di GoTaq® G2 Hot Start Polymerase (Promega) e 50 ng di DNA

- amplificazione: 2 minuti a 95 °C; (30 secondi a 95 °C, 30 secondi a 58 °C, 40 secondi a 72 °C) per 35 cicli; 5 minuti a 72 °C
- purificazione dei frammenti di PCR con kit NucleoSpin® Gel e PCR Clean-up
- il sequenziamento Sanger è stato effettuato da BMR Genomics (Padova)

### Risultati

Come atteso, il 100% dei campioni presenta una mutazione nella posizione 574 del gene ALS. L'analisi degli elettroferogrammi ha messo in evidenza la presenza di due sostituzioni aminoacidiche: Leucina al posto di Triptofano (Trp 574 Leu) in tutti i campioni testati (semi) di quattro delle sei popolazioni e Metionina al posto di Triptofano (Trp 574 Met) in tutti i campioni testati (semi) delle restanti due popolazioni.

La sostituzione Trp 574 Leu è ben nota ed è la più diffusa fra le varie possibili per la posizione 574 del gene ALS. La sostituzione Trp 574 Met è invece decisamente molto rara. Prima di questa prova era stata osservata solamente in *Apera spica-venti* (Repubblica Ceca, 2013) ed

in una popolazione di *A. hybridus* campionata dall'IPSP a San Stino di Livenza (VE) nel 2017.

### Discussione

*A. retroflexus* è sempre stata considerata la specie più diffusa in Friuli Venezia Giulia. Questo monitoraggio ha invece messo in evidenza la forte presenza di *A. hybridus*.

Lo *screening* con erbicidi ALS ha dimostrato chiaramente come la resistenza a questa classe di erbicidi sia estremamente diffusa sul territorio regionale, infatti solo quattro popolazioni sulle 57 campionate risultano suscettibili. Il sequenziamento parziale del gene ALS ha messo in evidenza la presenza di due sostituzioni aminoacidiche in posizione 574 del gene ALS all'interno delle popolazioni resistenti testate. Il vigore delle piante sopravvissute agli erbicidi ALS e la presenza della mutazione 574 nel 100% dei campioni testati, permette di affermare che il meccanismo principale di resistenza in queste popolazioni è di tipo *target-site*. Questo tipo di resistenza è di relativa facile gestione in quanto erbicidi con siti d'azione diversi da ALS sono ancora efficaci. In presenza di meccanismi di resistenza *non-target site*, come ad esempio la resistenza metabolica, la gestione delle infestanti resistenti può risultare molto più complessa, in quanto lo stesso meccanismo può causare re-

sistenza a diverse classi di erbicidi, riducendo così il numero di sostanze utilizzabili.

Con questa prova effettuata in condizioni controllate è stato confermato che metribuzin e metobromuron (erbicidi di pre-emergenza usati in soia) contengono completamente le popolazioni testate alla dose di campo. In un singolo caso sono stati osservati alcuni sopravvissuti al clomazone, ma le piante erano poco sviluppate.

I risultati sono in linea con quanto emerso dalle prove svolte da ERSA nel corso degli anni: anche in condizioni di campo metribuzin, metobromuron e S-metholaclo (non testato nell'ambito di questa prova) risultano molto attivi nei confronti dell'amaranto.

Per quanto riguarda il clomazone, è necessario tenere presente che gli amaranti sono indicati come specie mediamente sensibili a questa sostanza attiva, che quindi andrebbe utilizzata sempre in combinazione con altri erbicidi dallo spettro complementare o nelle situazioni in cui sia indispensabile per la sua attività specifica nei confronti di *Abutilon theophrasti* (cencio molle).

Nonostante nell'ambito del progetto non sia stato possibile conoscere i dettagli riguardanti la conduzione agronomica dei singoli appezzamenti presso cui sono stati effettuati i campionamenti, è possibile fare alcune considerazioni di carattere generale. Nei territori oggetto d'indagine la rotazione più frequente è mais, soia, frumento + soia di secondo raccolto. Il controllo chimico delle infestanti è perciò strettamente legato all'uso degli erbicidi ALS, che si impiegano su tutte le tre colture, in particolare su quelle estive (mais e soia). A causa dei costi e della presenza diffusa di terreni ad elevata percentuale di sostanza organica, l'uso degli erbicidi di pre-emergenza è spesso limitato. L'impiego dei pre-emergenza è sostanzialmente nullo nel caso della soia di secondo

raccolto (semina attorno alla seconda-terza decade di giugno) su terreni non irrigui, in quanto non verrebbero garantiti i livelli di precipitazione necessari (circa 10 mm) alla corretta attivazione di questi erbicidi. Appare inoltre diffusa la pratica della semina di soia non certificata, in particolare per le coltivazioni in secondo raccolto, sulle quali l'agricoltore investe il meno possibile, non essendo sostenute dal contributo PAC.

Analizzata la situazione in cui di solito l'agricoltore si trova ad operare, si ricorda che per limitare l'evoluzione e la diffusione di resistenze agli erbicidi e, in generale, per un'adeguata gestione integrata delle piante infestanti, è necessario implementare tutte le buone pratiche agronomiche. Ovvero:

- tenere puliti da infestanti perennanti e annuali i terreni a riposo e in assenza di colture;
- attuare un'ampia rotazione, inserendo colture autunno-vernine per interrompere la germinazione consecutiva negli anni delle infestanti primaverili-estive;
- in abbinamento e in alternativa agli erbicidi sono sempre valide le lavorazioni meccaniche, eventualmente associate alla tecnica della falsa semina, ricordando che questi interventi sono sempre legati a condizioni pedoclimatiche favorevoli;
- alternare erbicidi a meccanismi d'azione differenti in modo da ridurre il rischio di selezionare flora infestante resistente;
- monitorare l'effetto degli erbicidi utilizzati in modo da poter intervenire in caso si verifichi una presenza ingiustificata di qualche infestante, eliminandola, anche manualmente o meccanicamente, per evitare che vada a seme;
- far seguire alla distribuzione di erbicidi di pre-emergenza un'irrigazione nel caso in cui non subentrino precipitazioni sufficienti ad attivarli entro una decina di giorni.