

## ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA ENZIMA EPSPS EM *Conyza bonariensis* RESISTENTE AO GLYPHOSATE

CARDINALI, V.C.B.<sup>1</sup>; DIAS, A.C.R.<sup>1</sup>, CAMPANA, F.B.<sup>2</sup>;  
FIGUEIRA, A.<sup>2</sup>; STEWART Jr, C.N.<sup>3</sup>, GOOD, L.<sup>3</sup>; CHRISTOFFOLETI, P.J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ESALQ/USP - Piracicaba, SP, vanessacardinali@yahoo.com.br, anacarolina.r.dias@gmail.com, pjchrist@esalq.usp.br. <sup>2</sup>CENA/USP - Piracicaba, SP, felippe@vivax.com.br; figueira@cena.usp.br. <sup>3</sup>University of Tennessee - Knoxville, TN - USA, nealstewart@utk.edu; lgood1@utk.edu.

### Resumo

A EPSPS (5-enol-piruvil-shiquimato-3-fosfato sintase) é uma enzima indispensável na síntese dos aminoácidos aromáticos em plantas. O glyphosate, quando aplicado em plantas, compete pelo mesmo sítio de ação desta enzima e desta forma a transformação de shiquimato em corismato é interrompida. Atualmente a buva (*Conyza bonariensis*) vêm apresentando casos de resistência em diversos países, porém seu mecanismo de resistência ainda não foi elucidado. Nesse sentido, este estudo teve por objetivo comparar os níveis da expressão gênica da EPSPS em biótipos de *C. bonariensis* resistente (R) e suscetível (S) ao glyphosate. Para tal, plantas de *C. bonariensis* contendo nove folhas verdadeiras foram submetidas a uma aplicação de glyphosate na dose equivalente a 720 g e a ha<sup>-1</sup>. Amostras da parte aérea de plantas dos dois biótipos R e S foram coletadas 24 horas após o tratamento (HAT). Extração do c-DNA das plantas foi realizada e primers específicos para os genes codificadores da EPSPS 1, 2 e 3 foram desenhados com base em seqüências de *Conyza canadensis* depositadas no GenBank (AY545666, AY545667 e AY545668). Primers para o gene *elongation factor EF-1 alpha chain (EF1- $\alpha$ )* baseados na seqüência de *Arabidopsis thaliana* também foram desenhados. Posteriormente, reações de PCR foram realizadas em termociclador para a viabilização do cDNA e dos primers. A análise dos fragmentos obtidos foi feita através de eletroforese em gel de agarose 2%. Os resultados mostraram que existe alto grau de similaridade entre as seqüências obtidas dos genes EPSPS de *C. bonariensis* e as seqüências de *C. canadensis* depositadas no GenBank. Além disso, é possível sugerir que há relação entre a expressão dos genes EPSPS em *C. bonariensis* e a condição de resistência à ação do herbicida glyphosate em plantas da espécie.

**Palavras-Chave:** Buva; EPSPS; Genes; Primers

### Abstract

The EPSPS (5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase) is an essential enzyme for aromatics amino acids synthesis in plants. The glyphosate, when applied in plants, competes for the same site of action of this enzyme and then, shikimate in corismate transformation is interrupted. So, the objective of this study was to compare the level of the EPSPS expression in resistant (R) and susceptible (S) biotypes of *C. bonariensis* to glyphosate. For this, plants of *C. bonariensis* containing nine true leaves were submitted a glyphosate application in a dose equivalent to 720 g e. a. ha<sup>-1</sup>. Samples of aerial parts of the R and S plants were collected 24 hours after the treatment (HAT). The c-RNA extraction and the primers of the plants for the gens responsible for the codification of EPSPS1, 2 and 3 were designed based on the *Conyza canadensis* sequence bank founded in the GenBank (AY545666, AY545667 e AY545668). Primers for the gen *elongation factor EF-1 alpha chain (EF1- $\alpha$ )* based on the sequence of *Arabidopsis thaliana* were employed. Subsequently, PCR reactions were conducted in a themocycle for the c-DNA and primers viability. The analysis of the fragments obtained was conducted by eletrophoresis agarosis gel 2%. The results showed that there is a high similarity between the sequences obtained in EPSPS gens of *C. bonariensis* the sequence of *C. canadensis* founded in GenBank. Besides, it is possible to suggest that there is relation between EPSPS gen expression in *C. bonariensis* and the condition of resistance to glyphosate action in plants of this specie.

**Key Words:** Hairy-fleabane; EPSPS; Genes; Primers

## Introdução

Atualmente, o glyphosate é um dos herbicidas mais utilizados no Brasil e no mundo, no combate às plantas daninhas. Sua utilização repetitiva em áreas de culturas geneticamente modificadas com o gene tolerância ao glyphosate, bem como em áreas não agricultáveis, tem resultado no aparecimento de biótipos de plantas daninhas resistentes a este herbicida, como é o caso da buva resistente *C. canadensis*, descoberta em Delaware nos EUA em 2001 (VanGessel, 2001).

Assim como a *Conyza canadensis*, a *C. bonariensis* também desenvolveu resistência ao glyphosate sendo que os primeiros casos de resistência desta espécie foram relatados em pomares e vinícolas da África do Sul no ano de 2003, e posteriormente, em 2004 e 2005 em pomares da Espanha e Brasil, respectivamente (Heap, 2008).

Embora os primeiros casos de buva resistente ao glyphosate tenham ocorrido a cerca de oito anos, o mecanismo de resistência que ocorrem nestas manifestações ainda não foram bem definidos. De acordo com Powles e Preston (2006) os dois principais mecanismos que parecem estar envolvidos na resistência de plantas ao glyphosate são a alteração no sítio da EPSPS e a redução da translocação do herbicida pelos tecidos meristemáticos da planta.

Nos trabalhos realizados por Feng et al. (2004) e Koger e Reddy (2005), os autores atribuíram a resistência encontrada em biótipos destas espécies à redução na translocação do glyphosate para as regiões meristemáticas das plantas. Já o trabalho realizado por Mueller et al. (2003) sugerem a possibilidade da existência de isômeros da enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) em plantas resistentes, os quais possuiriam menor afinidade pela molécula de glyphosate, conferindo o caráter de resistência às plantas. Estudos realizados com *Eleusine indica* mostraram que uma substituição do aminoácido prolina pela serina na posição 106 do sítio alvo da enzima EPSPS, ocasionada por uma mutação, levou a uma redução na suscetibilidade ao glyphosate (Baerson, 2002). Estudos subsequentes com *E. indica* da Malásia também identificaram uma substituição da prolina pela treonina na posição 106 em plantas resistentes ao glyphosate (Ng et al., 2003). Mutações pontuais resultantes da substituição da serina e treonina na posição 106 do sítio da EPSPS, também foram identificadas em plantas de *Lolium multiflorum* (azevém) oriundas do Chile (Perez-Jones et al., 2007). Estudando a mesma espécie azevém, Jasieniuk et al. (2008) encontraram uma mutação na posição 106 resultante da substituição da prolina pela alanina e consideraram tal alteração como o mecanismo de resistência da espécie ao glyphosate. Pelo fato de os mecanismos de resistência em *C. bonariensis* ainda não terem sido totalmente elucidados, este trabalho teve por objetivo comparar os níveis de expressão gênica da EPSPS em biótipos resistente e suscetível de *C. bonariensis*.

## Material e Métodos

O experimento foi instalado em casa de vegetação do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ - USP, localizado em Piracicaba – SP, entre fevereiro e maio de 2009. Para tal, duas populações de buva (*Conyza bonariensis*), sendo uma resistente oriunda do município de Cruz Alta- RS e uma suscetível coletada no município de Piracicaba-SP em uma área sem histórico de aplicação de glyphosate foram utilizadas no experimento. Quando as plantas atingiram o estágio fenológico de 8-9 folhas realizou-se uma aplicação de glyphosate comercial na dose de campo recomendada (720 g e.a. ha<sup>-1</sup>). Decorridas 24 horas após a aplicação, amostras da parte aérea das plantas foram coletadas e armazenadas em freezer a -80°C até o processamento das análises.

Para se obter o RNA total das amostras, aproximadamente 100 mg de tecido foram macerados em nitrogênio líquido com a adição de 5 % polivinilpirrolidona (PVPP). A extração de RNA ocorreu utilizando “TRIzol Reagent”. A integridade do RNA total extraído foi confirmada por eletroforese em gel de 1,2 % agarose em tampão 1X SB, aplicando-se uma alíquota do RNA total extraído de cada amostra sendo a quantificação do RNA extraído feita através da utilização de um espectrofotômetro. Após a quantificação do RNA total extraído, cerca de 12,5 µg de cada amostra foram submetidos à tratamento com DNase I (Fermentas). Em seguida, foi realizada a síntese da primeira fita do cDNA utilizando-se uma parte do RNA total tratado com a enzima ImProm (Promega) e RNaseOUT (Invitrogen).

Posteriormente, foram desenhados *primers* específicos para os genes codificadores da enzima 5-enol-piruvil-shiquimato-3-fosfato sintase 1, 2 e 3 (*EPSPS1*, *EPSPS2* e *EPSPS3*, respectivamente) baseados em seqüências de *Conyza canadensis* depositadas no GenBank (AY545666, AY545667 e AY545668, respectivamente). Também foram desenhados *primers* para o gene *elongation factor EF-1*

*alpha chain (EF1- $\alpha$ )* baseados na seqüência de *Arabidopsis thaliana* depositada no GenBank, nº de acesso AK221176, que foi utilizado como gene-referência em alguns experimentos. Para isso foi utilizado o programa Primer3, disponível no “site” <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/> (Rozen & Skaletsky, 2000) e um programa específico para verificação da estabilidade dos *primers* – NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>).

Subsequentemente, as amostras de cDNA sintetizado foram submetidas à reações de PCR. A temperatura para anelamento dos “primers” utilizados foi de 60°C. Foram realizados de 35 a 40 ciclos no termociclador com 30-60 segundos a temperatura de 72°C para ação extensiva da *Taq*-polimerase.

Os fragmentos obtidos com as reações de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de 2% agarose em tampão 1 X SB. Os fragmentos gerados foram clonados no vetor pGEM-T *Easy Vector System* (Promega), e foram encaminhados para seqüenciamento para confirmar a identidade de suas seqüências.

As análises de RT-qPCR foram realizadas em um termociclador centrífugo RotorGene 3000, Corbett Research a partir de diluições 1:10 do cDNA total derivado da transcrição reversa das amostras de RNA tratadas com DNAase, sendo analisadas triplicatas de cada amostra.

A amplificação foi conduzida em incubações iniciais a 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 min e seguidas de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 62°C por 30 seg (para o conjunto de *primers* EF1- $\alpha$ ) e 60°C por 30 seg (para os outros conjuntos de *primers*), com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. Após a termociclagem, uma curva de desnaturação foi obtida entre 72°C e 95°C, determinando as curvas de dissociação de cada produto amplificado.

## Resultados e Discussão

A eletroforese obtida mostrou que todas as amostras de cDNA apresentaram amplificação esperada (150 pb), o que indica que os *primers* que haviam sido desenhados sobre a seqüência de *Arabidopsis thaliana* são eficazes para a utilização em *C. bonariensis*. A especificidade desse conjunto de *primers* também foi comprovada através do resultado do seqüenciamento dos fragmentos gerados. Os fragmentos obtidos apresentaram similaridade com o gene EF1- $\alpha$  (AK221176) de *A. thaliana*.

A reação que utilizou os *primers* EPSP1\_2\_F e EPSP1\_R (responsável pela amplificação de trecho do cDNA do gene *EPSPS1*) também foi realizada com êxito.

A especificidade desse conjunto de *primers* também foi confirmada através do seqüenciamento dos fragmentos gerados, que apresentaram similaridade com a seqüência do gene *EPSPS1* (AY545666) de *C. canadensis*, seqüência sobre a qual os *primers* foram desenhados.

Os *primers* EPSP2art-F e EPSP2art-R deveriam ser responsáveis por amplificar apenas seqüência (816 pb) do cDNA do gene *EPSPS2*. Mas, foi verificado que uma região do gene *EPSPS3* também poderia ser alvo de amplificação por EPSP2art-F e EPSP2art-R. Os testes de amplificação realizados com esses *primers* não apresentaram amplificação de fragmentos de 800 pb (referentes à seqüência do cDNA de *EPSPS2*), mas apresentaram amplificação de fragmentos de aproximadamente 200 pb (que teoricamente se referem à seqüência do cDNA do gene *EPSPS3*).

Por outro lado o resultado da análise do seqüenciamento dos fragmentos gerados por essa reação indicou que as seqüências apresentavam trechos de similaridade tanto com o gene *EPSPS2* (AY545667) quanto com o gene *EPSPS3* (AY545668) de *C. canadensis*. A comparação entre as seqüências dos genes depositadas no GenBank mostrou que *EPSPS3* apresenta quase total similaridade com trechos de *EPSPS2*. Ainda em relação ao gene *EPSPS3*, foi obtido êxito nas reações de PCR utilizando os *primers* EPSP3\_F e EPSP3\_R (desenhados especificamente para amplificarem uma região de 154 pb do cDNA desse gene). Os fragmentos gerados com essas reações de PCR também apresentaram seqüências similares tanto à região do gene *EPSPS2* quanto a região do gene *EPSPS3* de *C. canadensis*.

Em geral foi constatado que as análises das seqüências dos fragmentos gerados indicaram forte similaridade entre os genes *EPSPS* de *C. canadensis* e *C. bonariensis* (e com *A. thaliana* no caso do gene EF1- $\alpha$ ), o que sugere, particularmente baseado nessas comparações, que esses genes são evolutivamente conservados entre essas espécies.

A análise dos dados apresentados na figura 1 permite propor que a expressão do gene *EPSPS1* em *C. bonariensis* possa estar relacionada à condição de resistência da planta ao tratamento com glyphosate. Nos biótipos resistentes (na figura, ‘Cb R n trat’ e ‘Cb R trat’) o nível de expressão gênica aparece sempre maior em relação ao nível de expressão dos biótipos suscetíveis (na figura, ‘Cb S n trat’)

e 'Cb S trat'). Também é observado que ocorre uma queda na produção de transcritos desse gene após 24 horas da aplicação do herbicida glyphosate, mas ainda assim o biótipo resistente apresenta maior nível de expressão se comparado ao biótipo suscetível.

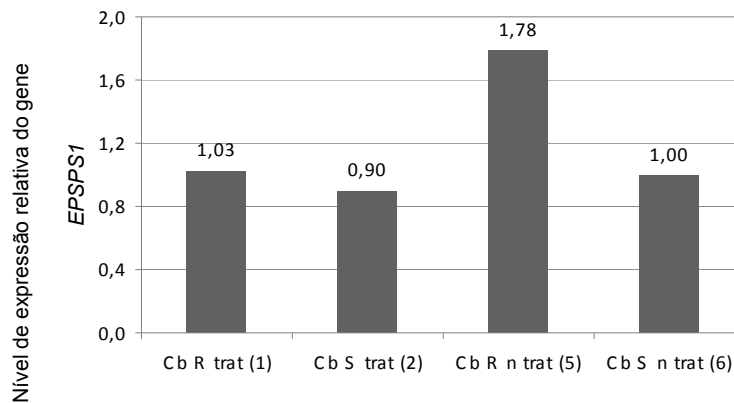


Figura 1. Expressão gênica relativa de *EPSPS1* em tecidos de *C. bonariensis* resistente (**Cb R**) ou suscetível (**Cb S**) submetidos (**trat**) ou não (**n trat**) ao tratamento com glyphosate

A Figura 2 abaixo apresenta o resultado da análise da expressão do gene *EPSPS2/EPSPS3* (analisado duplamente devido aos dois conjuntos de *primers* utilizados). A amostra calibradora utilizada novamente foi *C. bonariensis* suscetível sem tratamento com glyphosate ("Cb S n trat" na figura).

A mesma relação observada para *EPSPS1*, foi observada para o gene *EPSPS2/EPSPS3*, ou seja, é possível que um alto nível de expressão basal do gene *EPSPS2/EPSPS3* também possa ser em parte responsável por conferir a resistência à ação do glyphosate em *C. bonariensis*. Aparentemente o nível de expressão do transcrito desse gene também diminui após submeter ambos os biótipos ao tratamento com o herbicida.

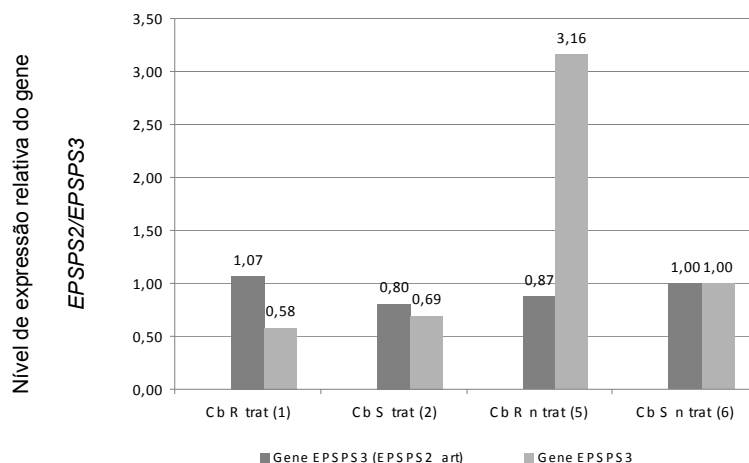


Figura 2. Expressão gênica relativa de *EPSPS2/EPSPS3* (analisado duplamente pelos dois pares de *primers* EPSPS2\_art e EPSPS3) em tecidos de *C. bonariensis* resistente (**Cb R**) ou suscetível (**Cb S**) submetidos (**trat**) ou não (**n trat**) ao tratamento com glyphosate

Avaliando o nível de expressão gênica de *EPSPS2* em *C. bonariensis*, Dinelli et al. (2008) também sugeriram que o nível basal dos transcritos em biótipos resistentes de *C. bonariensis* eram de 2-3 vezes mais altos que aqueles observados nos biótipos suscetíveis (antes da aplicação de glyphosate) e que esse fato, aliado com a forma de translocação do glyphosate nessa espécie, ajudam a diminuir a inibição de *EPSPs* pelo herbicida.

Estudos já realizados com *C. canadensis* também acusam um maior nível de expressão do mRNA de *EPSPS2* (2-3 vezes) em biótipos resistentes sem tratamento com glyphosate, corroborando com os dados apresentados. Em *C. canadensis* a síntese de transcritos *EPSPS* não foi induzida em resposta aplicação do herbicida (Dinelli et al., 2006).

Desta forma, com este trabalho, podemos concluir que, existe alto grau de similaridade entre as seqüências obtidas dos genes *EPSPS* de *C. bonariensis* e as seqüências de *C. canadensis* depositadas no GenBank. Além disso, é possível sugerir que há relação entre a expressão dos genes *EPSPS* em *C. bonariensis* e a condição de resistência à ação do herbicida glyphosate em plantas da espécie.

### **Agradecimentos**

Agradecemos a Monsanto do Brasil pelo apoio financeiro concedido.

### **Literatura Citada**

BAERSON, S.R. et al.. Glyphosate-resistant goosegrass: identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1265–1275, 2002.

DINELLI, G. et al.. Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. Biotypes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 86, p. 30–41, 2006.

DINELLI, G. et al. Physiological and molecular bases of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain. **Weed Research**, v. 48, p. 257–265, 2008.

FENG, P.C.C. et al. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. **Weed Science**, v. 52, p. 498-505, 2004.

HEAP, I. **The international survey of herbicide resistant weeds**. 2008. Disponível em: <<http://www.weedscience.com>>. Acesso em: 30 abr. 2008.

JASIENIUK, M. et al. Glyphosate-resistant italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in california: Distribution, response to glyphosate, and molecular evidence for an altered target enzyme. **Weed Science**, v. 56, p. 496-502, 2008.

KOGER, C.H.; REDDY, K.N. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). **Weed Science**, v. 53, p. 84–89, 2005.

MUELLER, T.C. et al. Shikimate accumulates in both glyphosate-sensitive and glyphosate resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 680–684, 2003

NG, C.H. et al. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and –susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. **Weed Research**, v. 43, p. 108–115, 2003.

PEREZ-JONES, A et al. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. **Planta**, v. 226, n. 2, p. 395-404, 2007.

POWLES, S.B.; PRESTON, C. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. **Weed Technology**, v. 20, p. 282–289, 2006.

VANGESSEL, M.J. Glyphosate resistant horseweed from Delaware. **Weed Science**, v. 49, p. 703-705, 2001.