

## COMPARAÇÃO DA ESTRUTURA DO GENE EPSPs DE PLANTAS DE CAPIM-AMARGOSO

BRAGA.<sup>3</sup>, I.M.R.F. (FCAV - Unesp, Jaboticabal/SP - isa.marcela@hotmail.com ), BARROSO, A. A. M.<sup>1</sup>, GALEANO, E.<sup>1</sup>, RUBIO, A. L.<sup>2</sup>, SANTOS, F.<sup>1</sup>, VICTORIA FILHO, R.<sup>1</sup>, CARRER, H.<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ-Piracicaba-SP, Brasil. <sup>2</sup> Universidad de Antioquia, Medellín, Colômbia. <sup>3</sup> Universidade Estadual Paulista – UNESP, Brasil).

**RESUMO:** A resistência das plantas daninhas aos herbicidas é um fenômeno natural que ocorre entre indivíduos dentro de uma população. No Brasil, recentemente, detectou-se a resistência do capim-amargoso (*Digitaria insularis*) ao herbicida glyphosate. Há vários mecanismos de resistência das plantas daninhas, a maioria regulada por alterações genéticas no local de ação dos herbicidas. Neste estudo, sequências de DNA de *D. insularis* foram usadas para analisar a diversidade genética, obter redes de haplotipos e comparar a estrutura éxon-íntron através dos táxons. Este estudo encontrou redução na variabilidade genética em plantas resistentes ao herbicida, se comparado ao biótipo suscetível. Entre as classes, a estrutura íntron-éxon mostrou-se ser uma região conservada, com íntrons maiores nas plantas dicotiledôneas.

**Palavras-chave:** resistência a herbicidas, redes de haplotipos, estrutura íntron-éxon

### INTRODUÇÃO

O uso de herbicidas é a técnica mais usada para controlar plantas daninhas em campos agrícolas. O glyphosate é um herbicida não seletivo que inibe a enzima EPSPS (5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase). Este herbicida tem baixo custo, baixo impacto ambiental e boa eficácia com amplo espectro de controle de plantas daninhas (PRESTON e WAKELIN, 2008). Seu uso repetitivo selecionou plantas daninhas resistentes. No Brasil, a resistência ao glyphosate foi descrita recentemente para o capim-amargoso (*Digitaria insularis*) (CARVALHO et al., 2011).

Vários mecanismos das plantas são conhecidos por promover resistência aos herbicidas. Dentre eles, as mutações da sequência gênica responsável pela síntese das enzimas, alvo da ação dos herbicidas, as mais comuns. No capim-amargoso, as mutações da sequência do gene EPSPs foram encontradas nas posições 182 e 310,

alterando uma prolina por uma treonina e uma tirosina por uma cisteína, respectivamente. Nesta planta, resistência ao glifosato no sítio não-alvo também foi observada, com diferente absorção, translocação e metabolização do glifosato nas plantas resistentes (CARVALHO et al., 2012). O objetivo deste estudo foi o de compreender a diversificação genética entre plantas resistentes e suscetíveis ao glyphosate de capim-amargoso.

## MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de plantas *D. insularis* resistentes e suscetíveis ao glyphosate foram coletadas de diferentes campos agrícolas do Estado de São Paulo. As sementes foram semeadas em bandejas de poliestireno contendo o substrato PlantMax® (Agronova, Brasil), e as mudas foram transferidas para vasos. As plantas foram cultivadas em estufa a 26/18°C (dia/noite) com 85% de umidade relativa.

Amostras congeladas de tecidos de 1.0 g foram moídas em pó fino em nitrogênio líquido, utilizando-se almofariz e pistão esterilizados. A extração do DNA (de todas as amostras) foi realizada de acordo com Doyle; Doyle (1987). A qualidade do DNA extraído foi avaliada em gel de agarose. 1 µl de cada extração foi analisada por espectrofotometria através do Espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., EUA) e somente as amostras de DNA de relação 260/280 próximas a dois foram usadas para análises posteriores. Estas amostras foram sequenciadas (3100 Genetic Analyzer) e editadas no programa BioEdit. Nas comparações das estruturas do gene, os dados foram comparados as espécies de *Amaranthus palmeri*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa* e *Eleusine indica*.

As distâncias genéticas entre as espécies para os fragmentos de *EPSPs* foram estimadas, excluindo íntrons e assumindo diferentes taxas para substituições de bases (modelo Kimura 2P). A distância de matriz entre as espécies foi produzida, seguindo um cladograma de distância pelo modelo vizinho mais próximo e reamostragem topológica usando a técnica de “bootstrap”, no cladograma resultante. O teste topológico foi realizado usando a probabilidade máxima com a estratégia de inicialização, ambas abordagens foram testadas no software MEGA. Foi empregada uma rede de parcimônia usando TCS para estabilizar a relação entre as amostras e localidades (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000) e um teste de Mantel como parte do pacote R! (R core Team 2013) para explorar o possível cenário que suporta as diferenças genéticas existentes como consequência da distância geográfica na escala local.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Objetivando definir as plantas resistentes, uma curva dose-resposta foi realizada, usando biomassa fresca de plantas com 21 dias após a aplicação do herbicida, obtendo-se um valor de fator de resistência de 2,36.

A amplificação revelou um amplicon com primers de EPSPS resultante em uma banda de DNA entre 1.161 pb a 1.196 pb nas plantas resistentes e entre 887 pb e 1.187 pb nas sequências suscetíveis. No caso do cDNA, os tamanhos das sequências nas resistentes variou de 514 pb a 706 pb e nas sequências suscetíveis variou de 517 pb a 542 pb. A sequência de DNA da *D. insularis* mostrou semelhanças de 74-82%, enquanto a sequência de cDNA da *D. insularis* apresentou semelhança de 78-94% comparada a mesma sequência de outras gramíneas. As maiores semelhanças para o DNA foram obtidas em comparação com *Oryza sativa* (90%) e *Eleusine indica* (94%). As proteínas preditas para todas as sequências de cDNA foram pesquisadas usando-se o programa NCBI BLASTp e mostraram semelhanças maiores que 80% para todas as sequências.

O cladograma baseado na distância e a árvore de máxima verossimilhança revelaram dois grupos de plantas, resistentes e suscetíveis. O grupo de plantas suscetíveis (Mogi), com 99,3 % de inicialização, apresentou dois subgrupos, Mogi 7-8 e Mogi 1-5, 8 com suporte estatístico adequado. As demais, plantas resistentes, parecem pertencer a um grupo basal (menos complexo) no qual todas os espécimes demonstraram relações não resolvidas, devido a distâncias mais curtas na árvore, indicando menos sítios variáveis, o que foi observado nos valores de inicialização menores que 80% (Figura 1). A parcimônia das redes indicou uma diferença clara nestes dois grupos, onde as plantas susceptíveis exibiram bem mais variações, em termos de diversidade com 8 haplotipos, baseados em 121 sítios variáveis encontrados. Ademais, as plantas resistentes foram menos complexas e apenas dois haplotipos foram encontrados.

O gene *EPSPS* de capim-amargoso possui 8 éxons e 7 íntrons, correspondendo à estrutura encontrada em *Amaranthus palmeri*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa* e *Eleusine indica*. O gene *EPSPS* de *Amaranthus palmeri* é de aproximadamente 10,3 kb (GAINES et al., 2013), enquanto *Medicago truncatula*, *Oryza sativa* e *Eleusine indica* apresentaram tamanhos menores, de 5,9; 3,7 e 3.1 kb (incluindo os íntrons), respectivamente. Embora a estrutura do éxon entre as espécies não varie consideravelmente, os íntrons da *Amaranthus palmeri* são maiores se comparados a outras gramíneas. Adicionalmente, a estrutura exon-intron na porção 5' do gene diferiu entre as espécies: no caso da *Amaranthus palmeri*, seus três primeiros íntrons são

maiores comparados às gramíneas, conferindo maior tamanho genético, e *Medicago truncatula* exibe o primeiro éxon maior (577 pb) comparado a outras espécies. Ademais, *Medicago* apresentou no seu quinto íntron o tamanho de 1.128 pb, que garante maior tamanho genético. Ainda, *Digitaria insularis* (sequência parcial) exibe tamanhos semelhantes para o segundo, terceiro e quarto éxons comparados ao resto das espécies, e seus íntrons são semelhantes ao *Medicago truncatula*, *Oryza sativa* e *Eleusine indica*. Por outro lado, *Amaranthus palmeri* e *Medicago truncatula* pertencem a classe Magnoliopsida, o que pode explicar a similaridade na estrutura do gene *EPSPS* entre ambos, enquanto *Oryza sativa*, *Eleusine indica* and *Digitaria insularis* pertencem a mesma família (Poaceae), ordem (Poales) e classe (Liliopsida), levando a tamanhos semelhantes nos íntrons e éxons (Figura 2).

As diferenças das sequências do gene *EPSPS* das espécies revelaram importantes variações no tamanho de estrutura entre a taxa das gramíneas. A presença de múltiplos íntrons e seus tamanhos diferentes desempenham papel importante na aquisição da função gênica, tal como a incorporação de novos domínios funcionais, tais como a possível superexpressão da enzima EPSPS em plantas de caruru. Os íntrons podem ser gradativamente perdidos durante a evolução.

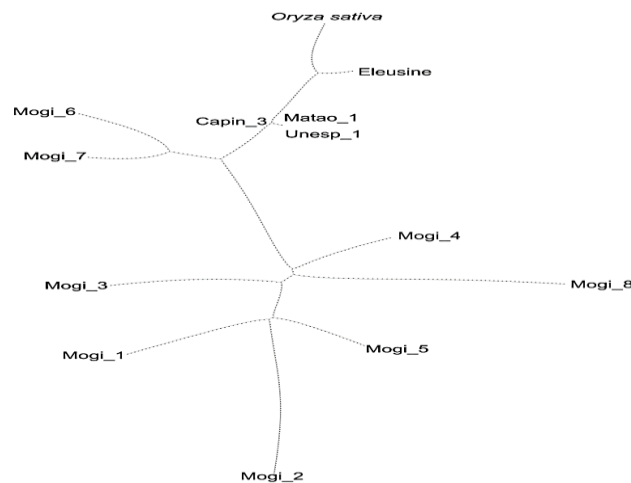


Figura 1. Rede de haplotipos baseados nas sequências de DNA de *D. insularis* resistentes e suscetíveis ao glyphosate.

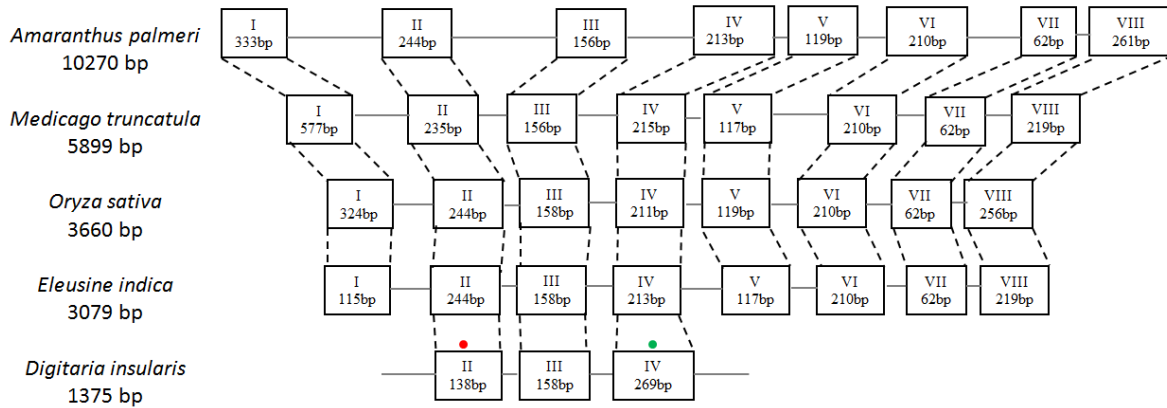


Figura 2. Comparação estrutural de parte do gene EPSPs de Capim-amargoso, em relação a outras plantas. Éxons são indicados pelos algarismos romanos. O tamanho de cada éxon é dado em pb (pares de base). Íntrons são indicados pelas linhas sólidas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores tiveram apoio da FAPESP e do CNPq.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, L.B.; ALVES, P.L.C.A.; GONZÁLEZ-TORRALVA, F.; CRUZ-HIPOLITO, H.E.; ROJANO-DELGADO, A.M., DE PRADO, R.; GIL-HUMANES, J.; BARRO, F.; DE CASTRO, M.D. Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. **J Agr Food Chem**, v. 60, p. 615-622, 2012.

CARVALHO, L.B.; CRUZ-HIPÓLITO, H.; GONZÁLEZ-TORRALVA, F.; ALVES, P.L.C.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; DE PRADO, R. Detection of sourgrass (*Digitaria insularis*) biotypes resistant to glyphosate in Brazil. **Weed Sci**, v. 59, p. 171-176, 2011.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v.9, n.10, p.1657-1660, 2000.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.J. A rapid DNA isolation procedures for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

GAINES, T.A.; WRIGHT, A.A.; MOLIN, W.T.; LORENTZ, L.; RIGGINS, C.W.; TRANEL, P.J.; BEFFA, R.; WESTRA, P.; POWLES, S.B. Identification of Genetic Elements Associated with *EPSPS* Gene Amplification. **PLoS One**, v.8, n.6, p. 65819, 2013.

PRESTON, C.; WAKELIN, A.M. Resistance to glyphosate from altered herbicide translocation patterns. **Pest Manag Sci**, v. 64 p.372-376, 2008.