

EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À DETOXIFICAÇÃO DE IMAZETAPIR EM CAPIM-ARROZ (*Echinochloa crus-galli*)

DALAZEN, G. (UFRGS, Porto Alegre/RS– giliardidalazen@gmail.com), MEROTTO JR, A. (UFRGS, Porto Alegre/RS– aldo.merotto@ufrgs.br), MARKUS, C. (UFRGS, Porto Alegre/RS– catarine.markus@gmail.com), PISONI, A. (UFRGS, Porto Alegre/RS– ale_pisoni@yahoo.com.br), MENEGUZZI, C. (UFRGS, Porto Alegre/RS– catimeneguzzi7@hotmail.com)

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de genes relacionados à detoxificação de imazetapir em plantas resistentes de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*). A expressão de genes *CYP* e *GST* foi avaliada em plantas resistentes e suscetíveis, 24 horas após a aplicação de 106 g de imazetapir ha⁻¹. O resultados obtidos indicam que os genes *CYP81A6* e *LrGSTF1* estejam envolvidos no processo de resistência de capim-arroz a este herbicida. Além disso, a maior expressão de um fator de iniciação de tradução (*EpIF4B*) também pode estar relacionada ao processo de resistência.

Palavras-chave: Plantas daninhas, resistência, metabolização, síntese protéica

INTRODUÇÃO

A resistência de plantas daninhas a herbicidas pode estar relacionada ao local de ação (resistência RLA) ou não relacionada ao local de ação do herbicida (NRLA). Entre os mecanismos RLA estão as mutações no gene que codifica a enzima alvo do herbicida, além da sua maior expressão e o maior número de cópias. Por outro lado, os mecanismos NRLA dizem respeito a mutações que alteram características como a absorção e translocação do herbicida, assim como a maior ação de enzimas detoxificadoras de herbicidas, tais como as enzimas citocromo-P450-monoxigenase (P450 ou *CYP*) e glutationa-S-transferase (*GST*) (POWLES; YU, 2010).

Algumas espécies de plantas daninhas resistentes a herbicidas ainda não apresentam os seus mecanismos de resistência totalmente elucidados, como é o caso de populações de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) resistentes a imazetapir (HEAP, 2014). O capim-arroz é uma das principais plantas daninhas da cultura do arroz irrigado no sul do Brasil (AGOSTINETTO *et al.*, 2010). Essa planta daninha pode provocar perdas de até 90% na produtividade do arroz, dependendo da densidade da infestante, cultivar e manejo da irrigação da lavoura (PINTO *et al.*, 2008). Há indícios de que a resistência de *E. crus-galli* a imazetapir em algumas populações do RS seja devida ao incremento de metabolização desses herbicidas por enzimas P450 (MATZENBACHER *et al.*, 2012). Da mesma forma,

biótipos resistentes de *E. crusgalli* nos Estados Unidos demonstraram como mecanismo parcial de resistência a herbicidas inibidores da enzima ALS a metabolização por P450 (RIAR et al., 2012). Na China, biótipos de *E. crusgalli*, resistentes a herbicidas inibidores da enzima ACCase, apresentaram maior atividade da enzima GST, ao serem comparados com biótipos de populações suscetíveis (HUAN et al., 2011). Dessa forma, o objetivo desse trabalho é identificar e avaliar a expressão de genes que codificam enzimas detoxificadoras de herbicidas (P450 e GST), possíveis responsáveis pela resistência e de capim-arroz ao herbicida imazetapir.

MATERIAL E MÉTODOS

As populações de capim-arroz foram selecionadas baseando-se em estudos prévios realizados. Estes estudos demonstraram que a resistência a imazetapir não está relacionada à insensibilidade da enzima, já que não foram constatadas mutações no gene ALS (BORTOLY, 2013). Além disso, a utilização de produtos inibidores de enzimas P450 reverteu a resistência em plantas da população resistente (MATZENBACHER et al., 2012). Baseado nisso, foi selecionada a população ARRGR01, resistente a imazetapir e quinclorac, originária de Arroio Grande (RS) e a população suscetível SUSSP01, oriunda de São Paulo (São Paulo).

Estudos de revisão de literatura levaram à seleção dos genes candidatos *CYP* e *GST*. Foram considerados genes que são citados como responsáveis tanto pela resistência de plantas daninhas quanto pela tolerância de culturas a herbicidas. A partir dessa revisão foram selecionados quatro genes *CYP* (P450) e três genes *GST* (Tabelas 1). Além dos genes *CYP* e *GST*, foi analisada a expressão do gene *EpEIF4B*, que codifica para um fator de iniciação de tradução.

Tabela 1. Genes *CYP* e *GST* candidatos avaliados e espécies em que esses genes estão relacionados em processos de detoxificação de herbicidas.

Gene	Código GenBank	Espécie	Referência
<i>CYP81A6</i>	DQ341412	<i>Oryza sativa</i>	PAN et al. (2006)
<i>CYP71C30</i>	AF321858	<i>Lolium rigidum</i>	FISHER et al. (2001)
<i>CYP71Ak2</i>	AB733990	<i>E. phyllopogon</i>	IWAKAMI et al. (2014)
<i>CYP72A254</i>	AB755796.1	<i>E. phyllopogon</i>	IWAKAMI et al. (2014)
<i>OsGSTL1</i>	DQ319906	<i>Oryza sativa</i>	HU et al., 2009
<i>LrGSTF1</i>	HF548530	<i>Lolium rigidum</i>	CUMMINS et al., 2013
<i>EcGST1</i>	JX518596	<i>Echinochloa crus-galli</i>	LI et al., 2013

Os *primers* foram desenhados a partir do programa Primer3Plus a partir de sequências depositadas no *Genbank*. Alguns *primers* disponíveis na literatura foram diretamente sintetizados, sem a necessidade de serem desenhados.

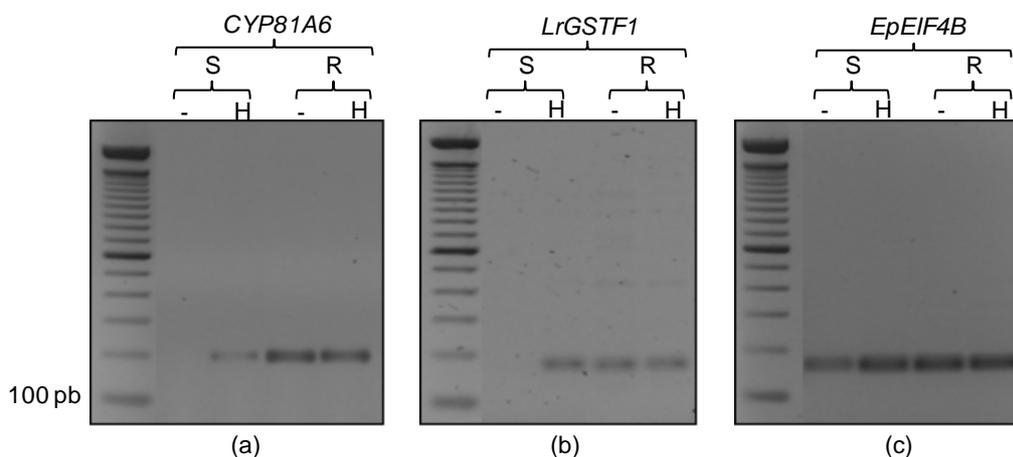
As sementes de capim-arroz foram acondicionadas em placas de Petri e mantidas em BOD (25°C) até a germinação. As plântulas foram transplantadas em copos perfurados na base, com volume de 200 mL, contendo como substrato a mistura de solo, composto orgânico e fertilizante. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas diariamente até o estágio de três a quatro folhas, momento em que foi realizada a pulverização do herbicida.

A aspersão dos herbicidas foi realizada em câmara de pulverização automatizada, utilizando-se volume de calda 200 L ha⁻¹ e ponta de pulverização do tipo DG 110.02, com pressão constante de 50 lb pol⁻² e velocidade de deslocamento de 1 m s⁻¹. A dose de imazetapir utilizada foi de 106 g de ingrediente ativo (ia) ha⁻¹, acrescido de adjuvante Dash (0,5%). Os tratamentos constaram de plantas resistentes (ARRGR01) e suscetíveis (SUSSP01), tratadas e não tratadas com o herbicida.

Amostras de aproximadamente 0,1g de folhas de plantas tratadas e não tratadas foram coletadas 24 horas após a aplicação dos herbicidas. A extração do mRNA foi realizada pelo método Trizol® (Invitrogen). A concentração de RNA extraído foi medida utilizando-se espectrofotômetro Genesys 2® (Thermo Spectronic), em comprimento de onda de 260 nm e diluído a 1 µg µL⁻¹. Uma alíquota de 3 µg de RNA total de cada tratamento foi tratada com DNase® I (Invitrogen). Em seguida, foi realizada a formação da fita complementar (cDNA) com a enzima transcriptase reversa SuperScript® III (Invitrogen), a partir de 3 µg de RNA utilizando iniciadores polidT. O cDNA obtido foi amplificado por reação de PCR e os produtos da reação para cada *primer* foram separados em gel de agarose (2%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos apontam que dois genes podem estar envolvidos no processo de resistência de capim-arroz ao herbicida imazetapir. O gene *CYP81A6* apresentou maior expressão nas plantas pertencentes à população resistente, quando comparado com as plantas da população suscetível (Figura 1a). Esse gene já foi identificado como responsável pela detoxificação de sulfoniluréias e bentazon em plantas de arroz (LIU *et al.*, 2012).



S: suscetível; R: resistente; R: com herbicida.

Figura 1. Expressão dos genes *CYP81A6* (a), *LrGSTF1* (b) e *EpEIF4B* (c) em plantas suscetíveis (S) e resistentes (R) de capim-arroz em resposta à aplicação de imazetapir (H).

Além do gene *CYP81A6*, um gene *GST* apresentou expressão diferencial em plantas resistentes. O gene *LrGSTF1* foi expresso em plantas resistentes, tanto na presença quanto na ausência de herbicida (Figura 1b). Esse gene foi identificado como responsável pela resistência múltipla de azevém (*Lolium rigidum*) (CUMMINS *et al.*, 2013). Além disso, ambos os genes (*CYP81A6* e *LrGSTF1*) foram expressos em plantas suscetíveis que receberam o herbicida. Embora a expressão tenha sido em menor nível, a presença de herbicida induziu a expressão do gene mesmo em plantas suscetíveis.

Além desses genes, foi identificada a expressão diferencial de um gene que codifica para um fator de iniciação de tradução. Resultados de análise em PCR em tempo real demonstraram que esse fator de iniciação foi expresso aproximadamente três vezes mais em plantas resistentes (dados não apresentados). O fator de iniciação de tradução *EpEIF4B* (Figura 1c), juntamente com outras proteínas, é responsável pelo processo de reconhecimento do mRNA pelo ribossomo durante o processo de síntese protéica (SPRIGGS *et al.*, 2010). Dessa forma, a maior expressão dessa proteína pode potencializar o efeito da maior expressão dos genes que codificam para enzimas de detoxificação, aumentando o conteúdo de enzimas de detoxificação.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam que tanto enzimas P450 quanto GST estejam envolvidas no processo de detoxificação do herbicida imazetapir em capim-arroz. Os genes *CYP81A6* e *LrGSTF1* foram mais expressos em plantas resistentes e em plantas suscetíveis tratadas com o herbicida. Além disso, a maior expressão de um fator de iniciação de tradução (*EpEIF4B*) pode estar envolvida nesse processo de resistência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINETTO, D. *et al.* Interferência e nível de dano econômico de capim-arroz sobre o arroz em função do arranjo de plantas da cultura. **Planta daninha**, v. 28, p. 993-1003, 2010.
- BORTOLY, E.D. **Avaliação do mecanismo de resistência à herbicidas e das relações filogenéticas de capim-arroz (*Echinochloa* spp).** 2013. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.
- CUMMINS, I. *et al.* Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. **PNAS**, v. 110, p. 5812-5817, 2013.
- FISCHER, T.C. *et al.* A general cloning strategy for divergent plant cytochrome P450 genes and its application in *Lolium rigidum* and *Ocimum basilicum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p 1014-1021, 2001.
- HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds.** Disponível em: www.weedscience.org. Acesso em 15 de junho de 2014.
- HU, T. *et al.* Enhanced tolerance to herbicide of rice plants by over-expression of a glutathione S-transferase. **Molecular Breeding**, v. 24, p. 409-418, 2009.
- HUAN, Z. *et al.* Resistance level and metabolism of barnyard-grass (*Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv.) populations to quizalofop-p-ethyl in Heilongjiang province, China. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 10, p. 1914-1922, 2011.
- IWAKAMI, S. *et al.* Cytochrome P450 genes induced by bispyribac-sodium treatment in a multiple-herbicide-resistant biotype of *Echinochloa phyllopogon*. **Pest Management Science**, v. 70, p 549-558, 2014.
- LI, G. *et al.* Identification and expression pattern of a glutathione S-transferase in *Echinochloa crus-galli*. **Weed Research**, v. 53, p. 314-321, 2013.
- LIU, C. *et al.* Expression of a rice *CYP81A6* gene confers tolerance to bentazon and sulfonyleurea herbicides in both *Arabidopsis* and tobacco. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, p. 419-428, 2012.
- MATZENBACHER, F.O. *et al.* Diagnóstico do mecanismo de resistência de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) a imazethapyr e quinclorac. In: XXVIII CBCPD, Campo Grande, MS, 2012.
- PAN, G. *et al.* Map-based cloning of a novel rice cytochrome P450 gene *CYP81A6* that confers resistance to two different classes of herbicides. **Plant Molecular Biology**, v. 61, p. 933-943, 2006.
- PINTO, J.J.O. *et al.* Controle de Capim-Arroz (*Echinochloa* spp.) em função de métodos de manejo na cultura do arroz irrigado. **Planta daninha**, v. 26, p. 767-777, 2008.
- POWLES, S.B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 317-347, 2010.
- RIAR, D.S. *et al.* Resistance of *Echinochloa crus-galli* Populations to Acetolactate Synthase-Inhibiting Herbicides International. **Journal of Agronomy**, v. 2012, 8 p., 2012.
- SPIRIGGS, K.A. *et al.* Translational Regulation of Gene Expression during Conditions of Cell Stress. **Molecular Cell**, v. 40, p. 228-237, 2010.