

INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA AO GLYPHOSATE NA ESPÉCIE *Digitaria insularis* ATRAVÉS DE POSSÍVEL MUTAÇÃO NA EPSPS

MELO, M.S.C. (ESALQ-USP, Piracicaba/SP - melomsc@yahoo.com.br), BRUNHARO, C.A.C.G. (ESALQ-USP, Piracicaba/SP - cabrunharo@ucdavis.edu), GAINES, T. A. (CSU - EUA, Fort Collins/CO - Todd.Gaines@colostate.edu), NISSEN, S. J. (CSU - EUA, Fort Collins/CO - Scott.Nissen@colostate.edu), NICOLAI, M. (AGROCON, Santa Bárbara d'Oeste/SP – mnicolai2009@gmail.com), SILVA, D. C. P. (ESALQ-USP, Piracicaba/SP – danilo_carvalho79@hotmail.com), CHRISTOFFOLETI, P. J. (ESALQ-USP, Piracicaba/SP - pedrochristoffoleti@gmail.com)

RESUMO: O capim-amargoso vem sendo um dos principais redutores de produtividade e uma das maiores preocupações quanto à estabilidade dos sistemas de produção no Brasil, principalmente devido sua habilidade de sobrevivência e reprodução após aplicações de glyphosate. Diante disso, foi realizada a presente pesquisa, com o intuito de verificar se as mutações documentadas na literatura estão presentes no gene que codifica a EPSPs em biótipos de capim-amargoso. Através do sequenciamento parcial da EPSPs, realizado no “Weed Molecular Laboratory” na Colorado State University, não foi possível encontrar mutações nas posições 106 e 182 nos biótipos resistente e suscetível estudados.

Palavras-chave: Sequenciamento genético; Aminoácidos; Capim-amargoso

INTRODUÇÃO

As plantas daninhas, como quaisquer outros seres vivos, estão continuamente evoluindo, portanto, sujeitas à seleção natural. A resistência de plantas daninhas a herbicidas nada mais é do que a seleção natural atuando em uma população selvagem devido à ação de um agente selecionador. O resultado dessa seleção, neste caso a presença de biótipos resistentes, vem sendo um dos maiores desafios nos sistemas agrícolas recentemente, sobretudo pelo fato de um número exponencial de novos casos de resistência terem sido reportados nas últimas décadas nos mais diversos sistemas de produção, associados principalmente à alta dependência de herbicidas (JASIENIUK et al., 2008). Até o momento, 218 espécies de plantas daninhas em 65 países foram identificadas como sendo resistentes à herbicidas em pomares, lavouras, pastagens e áreas não agrícolas (HEAP, 2014).

Os mecanismos que conferem resistência aos herbicidas nas plantas daninhas podem ser classificados como: (i) alteração no sítio de ação que o herbicida atua (NG et al., 2003; KAUNDUN et al., 2008; GAINES et al., 2010); ou (ii) diminuição da quantidade de herbicida que chega ao sítio de ação (GE et al., 2010; SHANER; LINDENMEYER; OSTLIE, 2011). Pesquisas apontam que o manejo no sistema de produção pode determinar se haverá o aparecimento de biótipos resistentes devido à alteração no sítio de ação do herbicida ou na quantidade que atinge o sítio de ação. O uso de dosagens de herbicidas superiores às recomendadas em rótulo podem selecionar biótipos com resistência por alteração no sítio de ação do herbicida e doses abaixo da recomendada tendem a selecionar biótipos com a habilidade de diminuir a quantidade de herbicida que atinge o sítio de ação (GARDNER; GRESSEL; MANGEL, 1998).

O capim-amargoso (*Digitaria insularis*) pode ser considerado com uma das grandes ameaças da produtividade de culturas agrícolas importantes no Brasil, com ênfase naquelas mais dependentes do herbicida glyphosate, uma vez em que esta planta daninha já foi previamente documentada como resistente ao glyphosate e esses biótipos estão amplamente distribuídos por todas as regiões agrícolas importantes no país. Portanto, o objetivo dessa pesquisa foi constatar um dos possíveis mecanismos que confere essa habilidade ao capim-amargoso.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram exportadas do Brasil aos Estados Unidos da América através do departamento de agricultura daquele país (USDA) e por meio de sua agência especializada na fiscalização de plantas e animais que regula a entrada e saída de material biológico (APHIS – Animal and Plant Health Inspection Service). As sementes dos biótipos suscetível e resistente ao glyphosate foram coletadas, respectivamente, na cidade de Piracicaba-SP (21° 37' 57" S; 48° 28' 46" W) e Matão-SP (22° 42' 30" S; 47° 38' 00" W).

As amostras dos biótipos foram coletadas de plantas cultivadas em casa-de-vegetação, da qual foi escolhido o tecido vegetal mais jovem, na quantidade de quatro repetições por biótipo. Este tecido vegetal amostrado foi estocado em um tubo eppendorf® e imediatamente mergulhado em nitrogênio líquido até o fim da coleta, dos quais em seguida foram armazenados em um freezer à temperatura de -80°C para posterior extração do material genético.

As amostras congeladas foram maceradas e em seguida foi usado o kit RNeasy[®] Plant Mini Kit, para a extração do RNA mensageiro das amostras (mRNA), conforme orientação do fabricante. Após a extração do RNA com a ajuda do kit acima citado, foi necessária a utilização de outro kit, o DNase I, Amplification Grade[®], para a digestão de DNA com uma e duas fitas para formas menores, ou seja, eliminação do DNA presente nas amostras, para que nelas contenham apenas RNAm, segundo especificações do fabricante. Após obter-se apenas RNA de fita simples, foi utilizado o último kit qScript™ cDNA SuperMix para a obtenção de DNA complementar (cDNA), conforme recomendações do fabricante. Com o cDNA sintetizado, procedeu-se com a confecção de primers específicos para amplificar apenas a sequência de ácidos nucleicos referentes ao gene que codifica a EPSPs. Através de diversas tentativas e erros, o primer que melhor amplificou a sequência desejada foi o seguinte: 5'- AGCTGTAGTCGTTGGCTGTG-3' representando o primer "forward" e 5'- GCCAACAAATAGCTCGCACT -3' representando o primer "reverse".

Em seguida, foi realizado o PCR tradicional (MyCycler™, Bio-Rad, EUA), em que foram utilizados os seguintes reagentes: 25uL de EconoTaq[®] PLUS Green Master Mix, 2uL dos primers forward e reverse (20mM), 1uL de cDNA (50ng uL⁻¹) e o restante com água pura até completar 50 uL por reação. O ciclo que obteve melhor desempenho dos primers foi o seguinte: 5 minutos a 95°C, 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 60°C, 1 minuto a 72°C e 3 minutos a 72°C. Os produtos foram submetidos à eletroforese, com solução tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA, pH 8,0) e gel de agarose a 1,5% para a separação do cDNA segundo seu tamanho em relação a fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder). As bandas obtidas por eletroforese em gel de agarose foram recortadas e purificadas através do kit QIAquick[®] Gel Extraction, seguindo orientações do fabricante, e em seguida enviadas para sequenciamento em departamento especializado da Colorado State University (PMF – Proteomics and Metabolomics Facility). Os resultados do sequenciamento foram analisados com a ajuda do software CHROMAS[®], e comparou-se os biótipos suscetível e resistente, a partir das quais foram tiradas conclusões sobre mutações nesse gene. Foi utilizado o software online ClustalW2 (LARKIN et al., 2007) para alinhamento das sequências obtidas com as sequências encontradas na literatura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura a seguir (Figura 1) ilustra as sequências obtidas de cDNA de ambos os biótipos suscetível e resistente, onde a sigla "DIGIN_S" representa o biótipo suscetível e "DIGIN_R" representa o biótipo resistente, além de um sequenciamento encontrado na literatura que é representado pela planta daninha *Lolium multiflorum* (LOLMU) (PEREZ-

JONES et al., 2007). O quadrado desenhado na posição superior da figura destaca a posição 106, comumente documentada como a posição em que ocorre substituição do aminoácido prolina por outro aminoácido e que confere resistência de planta daninhas ao glyphosate (PEREZ-JONES et al., 2007; WAKELIN; PRESTON, 2006; KAUNDUN et al., 2008).

O quadrado na parte inferior da imagem ilustra a posição 182, da qual foi documentada uma mutação e que esta está relacionada com a resistência do capim-amargoso ao glyphosate em biótipos do estado de São Paulo (CARVALHO et al., 2012).

```

DIGIN_S      GTGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGAACGGCAAATGCGGCCATTGACAGCAGCCGTAACT 60
DIGIN_R      GTGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGAACGGCAAATGCGGCCATTGACAGCAGCCGTAACT 60
LOLMU        GTC AAGCTCTTCTTGGGCAACGCTGGAAC TGC AATGCGGCCATTGACGGCTGTAGTA 60
              ** . ***** . ** . ***** . ***** . ***** . ** . ** . ** . . .

DIGIN_S      GCTGCTGGAGGAAATGCAACTTATGTGCTTGATGGAGTGCCAAGAATGCGGGAGAGACCC 120
DIGIN_R      GCTGCTGGAGGAAATGCAACTTATGTGCTTGATGGAGTGCCAAGAATGCGGGAGAGACCC 120
LOLMU        GCTGCTGGTGGAAATGCGACTTATGTCTTGATGGAGTACCAAGAATGAGGGAGCGACCT 120
              ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . **** .

DIGIN_S      ATTGGCGACTTGGTTGTTCGGATTGAAACAGCTCGGTGCGGATGTTGATTGCTTCCTTGGC 180
DIGIN_R      ATTGGCGACTTGGTTGTTCGGATTGAAACAGCTCGGTGCGGATGTTGATTGCTTCCTTGGC 180
LOLMU        ACCGGTGACTTAGTTGTTCGGTTTGAACAGCTAGGTGCGAATGTTGATTGTTTCCTTGGC 180
              * . * . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . *****

DIGIN_S      ACTGACTGCCACCTGTTTCGTGTCAAGGGAATTGGAGGGCTACCTGGTGGCAAGGTTAAG 240
DIGIN_R      ACTGACTGCCACCTGTTTCGTGTCAAGGGAATTGGAGGGCTACCTGGTGGCAAGGTTAAG 240
LOLMU        ACTGACTGCCACCTGTTTCGGATCAACGGCATTGGAGGGCTACCTGGTGGCAAGGTTAAG 240
              ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . *****

DIGIN_S      CTATCTGGCTCTATCAGCAGTCAGTACTTGAGTGCCTTGC 280
DIGIN_R      CTATCTGGCTCTATCAGCAGTCAGTACTTGAGTGCCTTGC 280
LOLMU        CTGTCTGGTTCCATCAGCAGCCAAATACTTGAGTTCCTTGC 280
              ** . ***** . ** . ***** . ***** . *****

```

Figura 1 – Sequenciamento parcial do gene que codifica a EPSPs. Fort Collins, 2014

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, não foi possível encontrar mutações no gene que codifica a EPSPs nos biótipos de capim-amargoso estudados, podendo-se concluir que este não é o mecanismo que confere resistência dessa planta daninha ao glyphosate.

AGRADECIMENTOS

A Colorado State University e todos os pesquisadores envolvidos neste trabalho

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, L.B.; et. al. Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 60, p. 615-622, 2012.
- GAINES, T.A.; et. al. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 107, p. 1029–1034, 2010.
- GARDNER, S.N.; et. al. A revolving dose strategy to delay the evolution of both quantitative vs. major monogene resistances to pesticide and drugs. **International Journal of Pest Management**, London, v. 44, p. 161-180, 1998.
- GE, X.; et. al. Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. **Pest Management Science**, Malden, v. 66, p. 345–348, 2010.
- HEAP, I. **The international survey of herbicide resistance weeds**. 2014. Disponível em: <www.weedscience.com>. Acesso em: 07 abr. 2014.
- 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**, Lawrence, v. 56, p. 496–502, 2008.
- KAUNDUN, S.V.; et. al. Importance of the P106S target-site mutation in conferring resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*) population from the Phillipines. **Weed Science**, Lawrence, v. 56, p. 637–646, 2008.
- LARKIN, M.A.; et. al. Cluslatl W and clustal X version 2.0, **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, p. 2947-2948, 2007.
- NG, C.H.; et. al. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and -susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. **Weed Research**, Oxford, v. 43, p. 108–115, 2003.
- PEREZ-JONES, A.; et. al. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. **Planta**, Berkeley, v. 226, p. 395–404, 2007.
- SHANER, D.L. Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. **Weed Science**, Lawrence, v. 57, p. 118-123, 2009.
- WAKELIN, A.M.; PRESTON, C. A target-site mutation is present in a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population. **Weed Research**, Oxford, v. 46, p. 432–440, 2006.