

Resistência aos inibidores da ALS na espécie poliplóide *Bidens subalternans*.

Fabiane P. Lamego¹; Ribas A. Vidal¹; Augusto Kalsing¹; Ives C. R. Goulart¹; Carla A. Delatorre¹; Nilda R. Burgos², Aldo Merotto Jr.¹.

¹Faculdade de Agronomia - UFRGS, C. Postal 15100, 90001-970, Porto Alegre, RS. ²CSES - University of Arkansas, 1366 W Altheimer Drive, Fayetteville, AR 72704, USA.

RESUMO

O presente trabalho tem por objetivos quantificar níveis de resistência aos inibidores da enzima ALS em biótipo resistente (R) de picão-preto (*Bidens subalternans*), comparando com biótipo suscetível (S), bem como determinar a base molecular da resistência. Experimentos de curva de dose resposta e ensaios enzimáticos *in vivo* foram conduzidos na UFRGS, Porto Alegre e na University of Arkansas, Fayetteville, EUA, respectivamente. O biótipo R apresentou resistência cruzada aos diferentes grupos químicos dos herbicidas inibidores da ALS, sendo 166, 434 e 516 vezes resistente a imazethapyr, cloransulam e pyriithiobac, respectivamente, quando comparado ao biótipo S. O biótipo R também foi 17 vezes resistente ao herbicida chlorimuron. Deste modo, esta população resistente de picão-preto não pode mais ser controlada pelos inibidores da ALS e requer métodos/herbicidas alternativos para seu controle. Regiões do gene da ALS contendo domínios altamente conservados foram amplificadas, clonadas e seqüenciadas nos biótipos R e S. Uma vez que *B. subalternans* é poliplóide, diferentes alelos para o gene da ALS foram detectados após o sequenciamento. A completa seqüência de um dos alelos do biótipo R não apresentou mutações. O sequenciamento dos demais alelos está em fase de conclusão.

Palavras-chave: *Bidens subalternans*, acetolactato sintase, herbicida, poliploidia

ABSTRACT

Resistance to ALS-inhibiting herbicides in polyploid *Bidens subalternans*.

This research aims to quantify levels of resistance to ALS enzyme inhibitors in resistant (R) beggarticks (*Bidens subalternans*) biotype, relative to the susceptible (S) biotype and to determine the molecular basis of resistance. Whole-plant bioassays and enzyme assays *in vivo* were conducted at the UFRGS, Porto Alegre and at the University of Arkansas, Fayetteville, USA, respectively. The R biotype was cross-resistant to ALS inhibitors belonging to different chemical families, showing 166-, 434-, and 516-fold resistance to imazethapyr, cloransulam and pyriithiobac, respectively, when compared to S biotype. The R biotype also showed 17-fold resistance to chlorimuron. Therefore, this ALS-resistant beggarticks population can no longer be controlled by ALS inhibitors and alternative methods/herbicides will be needed to manage it. Regions of the ALS gene with highly conserved domains were amplified, cloned and sequenced in R and S biotypes. Since *B.*

subalternans is polyploid, several ALS alleles were detected in the sequencing process. The one fully sequenced allele harbored no mutations in the resistant biotype. Sequencing of other ALS alleles is ongoing.

Keywords: *Bidens subalternans*, acetolactate synthase, herbicide, polyploidy

INTRODUÇÃO

Bidens subalternans (picão-preto) DC. é uma das principais plantas daninhas dicotiledôneas que interferem negativamente com a soja. A partir de 1996, populações de picão-preto resistentes a chlorimuron e imazethapyr começaram a ser observadas na região Centro-Oeste (Monqueiro et al., 2000). Desde então, a ocorrência de *B. subalternans* resistente aos inibidores de ALS vem sendo observada em diferentes regiões do país (Pinto et al., 2006), o que afeta drasticamente a produtividade da soja, uma vez que esta é uma das suas principais infestantes. A presença de picão-preto pode causar danos da ordem de até 30% na produtividade da soja quando nenhum método de controle é utilizado (Rizzardi et al, 2003). Plantas daninhas apresentam resistência aos herbicidas através de diferentes mecanismos: absorção reduzida do produto, redução na quantidade de herbicida que atinge o local de ação da planta-alvo através de metabolização acentuada, seqüestro, ou ainda, uma alteração no local de ação evitando a ligação da molécula herbicida. Expressão diferencial de genes responsáveis por enzimas-alvo também pode ser responsável pela resistência a herbicidas. A maioria dos casos de resistência aos inibidores de ALS ocorre por mutação na enzima alvo (Tranel & Wright, 2002, Whaley et al., 2007). A base molecular da resistência aos inibidores da ALS na espécie poliplóide *B. subalternans* não foi relatada até então. Os objetivos deste trabalho são quantificar níveis de resistência aos inibidores da ALS em biótipo R de *B. subalternans* e identificar mutação(s) associada(s) à resistência.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes R e S de *B. subalternans* foram coletadas em Goiás e Rio Grande do Sul, respectivamente, em 2005. Plantas foram crescidas em vasos de 500 ml em casa-de-vegetação na UFRGS, Porto Alegre, em 2006 e na Universit of Arkansas, EUA, em 2007. As condições de crescimento foram 30:25 °C de temperatura com regime de luz de 14:10 h dia:noite. Plântulas em estágio de duas a quatro folhas foram utilizadas nos experimentos de dose-resposta. Tecidos de folhas jovens foram coletados para extração de DNA. A inibição causada pelos herbicidas inibidores da ALS *in vivo* em biótipos de *B. subalternans* foi avaliada usando um protocolo adaptado de Gerwich et al. (1993). Plântulas foram aspergidas com chlorimuron, cloransulam, imazethapyr e pyriithiobac, com

doses que variaram de 0.01 a 7000 g ia ha⁻¹, acrescidas de surfactante não-iônico a 0.25% v/v. As doses variaram de acordo com o herbicida aplicado. Três horas após aplicação dos herbicidas, as plantas foram aspergidas com 960 g ha⁻¹ de ácido ciclopropanodicarboxílico (CPCA). A atividade da enzima ALS foi avaliada 6 h após a aplicação dos tratamentos herbicidas através da quantificação de níveis de acetoína acumulada. Para isso, utilizou-se um ensaio colorimétrico e a absorbância foi determinada a 530 nm, em espectrofotômetro. Os dados foram expressos como porcentagem em relação às plantas não tratadas com herbicidas e analisados estatisticamente, utilizando o programa SAS. Curvas de dose resposta foram geradas usando a função log-logística através do programa Sigma Plot. A dose responsável por reduzir em 50% a atividade da enzima ALS (I₅₀) e o fator de resistência (R/S) foram calculados. Os ensaios foram repetidos duas vezes para cada biótipo, com três repetições.

DNA genômico foi extraído de plantas individuais usando um protocolo CTAB modificado (Doyle & Doyle, 1987). Seqüências da ALS depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) foram utilizadas para o desenho de primers para amplificação do gene em *B. subalternans*, separadamente, em três regiões. Os primers utilizados para amplificar as duas primeiras regiões produziram através de reação de cadeia de polimerase (PCR) mais de um produto, os quais foram clonados usando o TOPO TA Kit para clonagem (Invitrogen). Colônias positivas foram selecionadas e plasmídios com insertos foram isolados e enviados para sequenciamento. As seqüências foram analisadas, alinhadas e comparadas utilizando os programas Sequencer versão 4.8 e ClustalW2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os experimentos de dose-resposta e os ensaios enzimáticos, o biótipo R apresentou resistência cruzada a quatro famílias de inibidores de ALS (Tabela 1). O biótipo R foi 434 e 166 vezes resistente a cloransulam e imazethapyr, respectivamente, quando comparado ao biótipo suscetível (Figura 1). Ambos são herbicidas amplamente utilizados em lavouras de soja. Já, o maior R/S foi observado para o herbicida pyriithiobac e o menor, para chlorimuron. Deste modo, herbicidas/métodos alternativos de controle serão necessários visando evitar perdas no rendimento de lavouras de soja convencional quando infestações de *B. subalternans* R forem identificadas.

A análise das seqüências obtidas de diferentes regiões do gene da ALS confirmou haver mais de um alelo para ALS em *B. subalternans*, o que torna complexo o estudo da resistência nesta espécie. A seqüência completa de um alelo com 1650pb (550 aminoácidos) foi comparada às seqüências de ALS no GenBank e apresentou 89% de

similaridade com a sequência de ALS de *Helianthus annuus* (AY541452.1). A ausência de mutação em uma isoforma da enzima ALS no biótipo R não elimina a possibilidade de haver mutações contribuindo para a resistência nos demais alelos. Deste modo, a base molecular da resistência em *B. subalternans* ainda requer maiores estudos. Outros mecanismos para a resistência como absorção e translocação reduzidos, também podem estar envolvidos. Futuros estudos ainda poderão incluir análise da expressão e funcionalidade dos diferentes alelos de ALS presentes em *B. subalternans* e sua relação com a resistência.

LITERATURA CITADA

DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull.**, v.19, p.11-15, 1987.

GERWICK, B.C. et al. Rapid diagnosis of ALS/AHAS – resistant weeds. **Weed Tech.**, v.7, p.519-524, 1993.

MONQUEIRO, P.A., CHRISTOFOLLETI, P.J., DIAS, C.T.S. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da ALS na cultura da soja (*Glycine max*). **Planta Daninha**, v.18, p.419-425, 2000.

PINTO, J.J.O. et al. Resistência de picão-preto encontrada em lavoura de soja na metade sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.2, p.37-44, 2006.

PRADO, M.D., De Prado, R., FRANCO, A.R. Design and optimization of degenerated universal primers for the cloning of the plant acetolactate synthase conserved domains. **Weed Sci.**, v.52, p.487-491, 2004.

RIZZARDI, M.A. et al. Soybean grain yield losses due to interference by beggarticks and arrowleaf sida. **Ciência Rural**, v.33, p.621-627, 2003.

TRANEL, P.J.; WRIGHT, T.R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Sci.**, v.50, p.700-712, 2002.

WHALEY, C.M., WILSON, H.P., WESTWOOD, J.H. A new mutation in plant ALS confers resistance to five classes of ALS-inhibiting herbicides. **Weed Sci.**, v.55, p.83-90, 2007.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela concessão da bolsa Doutorado Sanduíche no período de Mar/2007 a Jan/2008, para realização de parte desta pesquisa na University of Arkansas, AR, EUA.
`A UFRGS, `a Prof. Nilda Burgos e aos alunos do seu laboratório na University of Arkansas, pelo apoio na realização deste trabalho.

Tabela 1. Ensaios enzimáticos *in vivo* para os biótipos de *B. subalternans* suscetível e resistente aos inibidores da ALS

Herbicidas	Biotypes	R ²	Equação da regressão	I ₅₀ (g ia ha ⁻¹) ^a	R/S
Chlorimuron	S	0.99	$Y=89/[1+(X/11.8)^{1.06}]$	9.56	--
	R	0.99	$Y=100.4/[1+(X/155.1)^{0.19}]$	162.8	17
Imazethapyr	S	0.99	$Y=102.6/[1+(X/21.4)^{0.53}]$	23.6	--
	R	0.99	$Y=100.6/[1+(X/3913.5)^{0.92}]$	3907.7	166
Cloransulam	S	0.98	$Y=100.5/[1+(X/0.73)^{0.37}]$	0.74	--
	R	0.99	$Y=99.8/[1+(X/327.4)^{0.17}]$	321.7	434
Pyrithiobac	S	0.99	$Y=99.2/[1+(X/14.1)^{0.54}]$	13.5	--
	R	0.99	$Y=99.1/[1+(X/8872.3)^{0.63}]$	7000	516

^a I₅₀ = dose herbicida estimada para reduzir em 50% a atividade da enzima ALS.

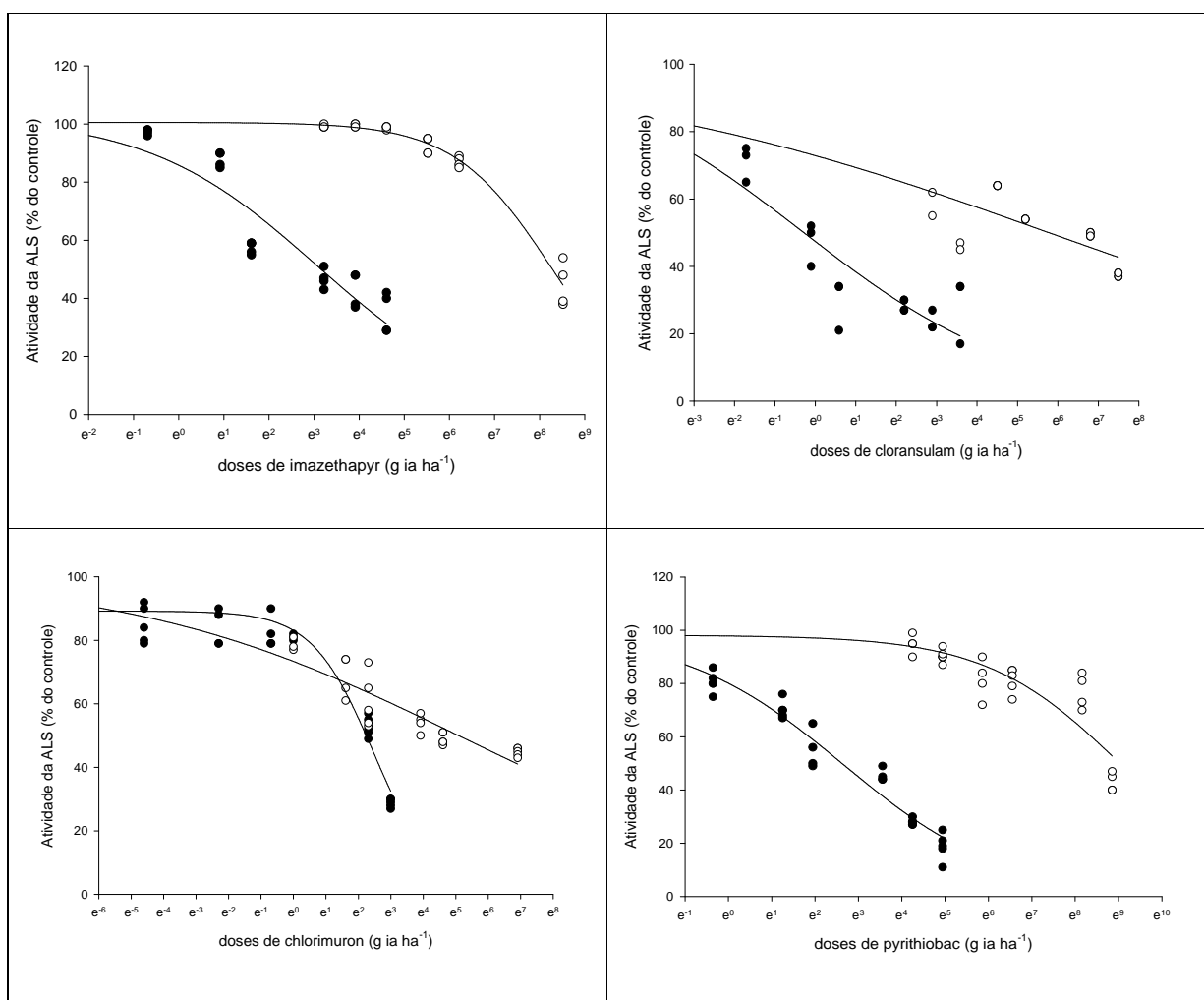


Figura 1. Efeito dos herbicidas imazethapyr, cloransulam, chlorimuron e pyrithiobac na atividade da enzima ALS *in vivo* dos biótipos S (●) e R (°) de *Bidens subalternans*.