

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

**Fabiane P. Lamego<sup>1</sup>; Ribas A. Vidal<sup>1</sup>; Augusto Kalsing<sup>1</sup>; Ives C. R. Goulart<sup>1</sup>; Carla A. Delatorre<sup>1</sup>; Nilda R. Burgos<sup>2</sup>, Aldo Merotto Jr.<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Faculdade de Agronomia - UFRGS, C. Postal 15100, 90001-970, Porto Alegre, RS. <sup>2</sup>CSES - 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<sup>-1</sup>, 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<sup>-1</sup> 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 (I<sub>50</sub>) 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.

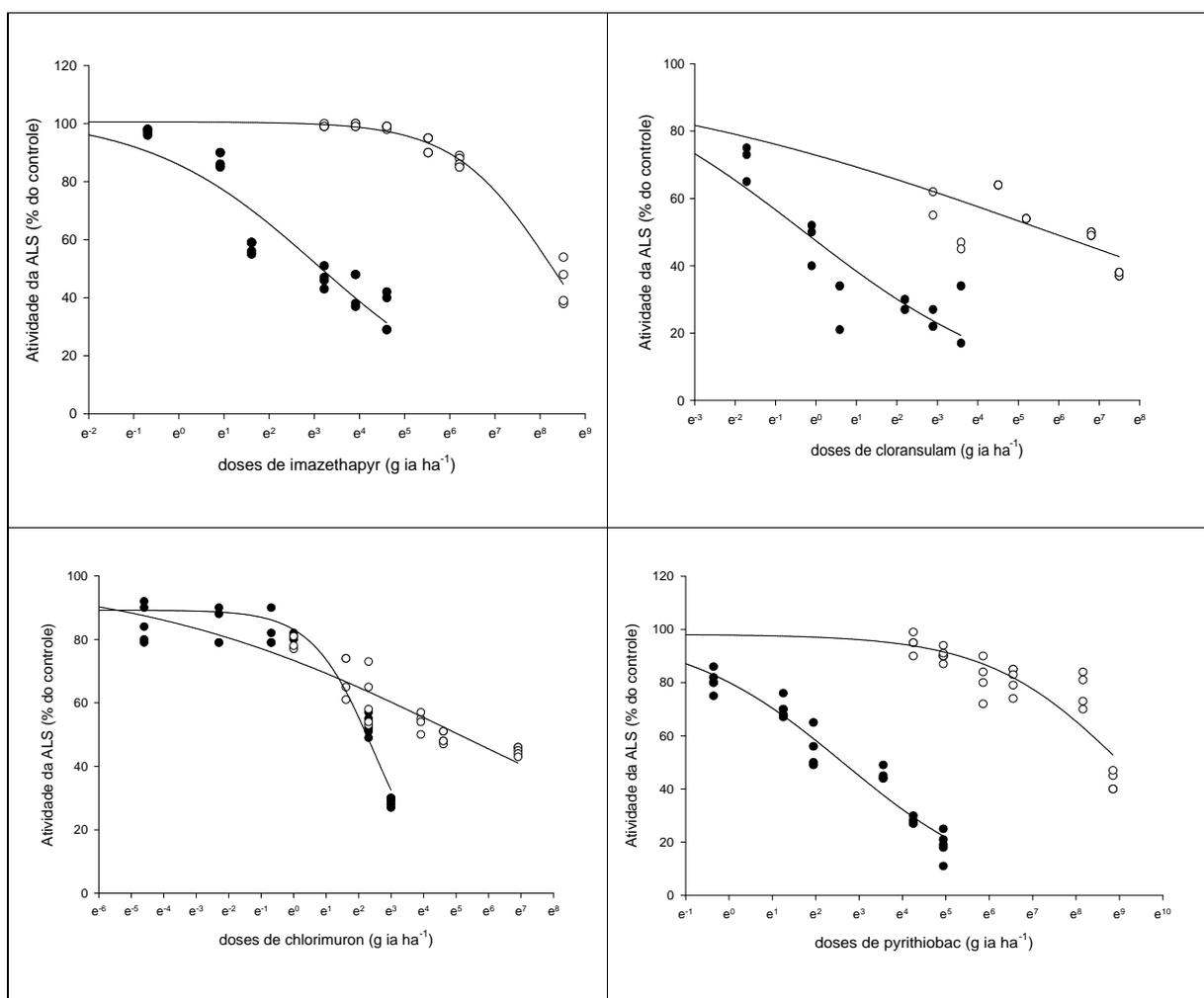
#### **AGRADECIMENTOS**

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 <sup>2</sup>	Equação da regressão	I <sub>50</sub> (g ia ha <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	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

<sup>a</sup> I<sub>50</sub> = 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*.