

Distância genética e geográfica entre acessos de picão-preto suscetíveis e resistentes a herbicidas inibidores da acetolactato sintase

Fabiane Pinto Lamego⁽¹⁾, Luciane Vilela Resende⁽²⁾, Paulo Roberto Da-Silva⁽³⁾, Ribas Antonio Vidal⁽⁴⁾ e Anderson Luis Nunes⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Dep. de Fitotecnia, Caixa Postal 15.100, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS. E-mail: fabilamego@yahoo.com.br, ander.nunes@zipmail.com.br ⁽²⁾Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/nº, Bairro Dois Irmãos, CEP 52171-900 Recife, PE. E-mail: lucianevilela@uol.com.br ⁽³⁾UFRGS, Centro de Biotecnologia. E-mail: paulo@cbiot.ufrgs.br ⁽⁴⁾UFRGS, Fac. de Agronomia, Dep. de Plantas de Lavoura. E-mail: ribas.vidal@ufrgs.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar o grau de similaridade genética entre acessos de picão-preto, suscetíveis e resistentes aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) e a relação entre similaridade genética e distância geográfica desses acessos. Sementes dos acessos foram coletadas no Estado do Paraná e cultivadas em casa de vegetação, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, em outubro de 2004. Depois da confirmação da resistência ou suscetibilidade dos acessos aos inibidores da enzima ALS, realizou-se a extração de DNA. Por meio da técnica de RAPD, foi possível avaliar a similaridade genética entre os acessos de picão-preto. Na análise conjunta dos acessos, dos 20 iniciadores utilizados, 17 apresentaram-se polimórficos, amplificando um total de 94 bandas. A similaridade genética média foi baixa e equivalente a 37%. A análise de regressão evidenciou que não há relação entre distância genética e geográfica nos acessos de picão-preto avaliados. A baixa similaridade geral entre esses acessos evidencia que a resistência aos herbicidas na região se configura pela seleção de indivíduos resistentes preexistentes na população.

Termos para indexação: *Bidens pilosa*, similaridade genética, resistência, picão-preto, RAPD, ALS.

Genetic and geographic distance among beggar-ticks accesses susceptible and resistant to acetolactate sintase herbicide inhibitors

Abstract – The objective of this work was to evaluate the degree of genetic similarity among beggar-ticks accesses, susceptible and resistant to acetolactate sintase (ALS) herbicide inhibitors and the relationship among the genetic similarity and geographic distance of this accesses. Beggar-ticks seeds were sampled at Paraná state and were grown in the greenhouse at Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, in October 2004. After the confirmation of resistance or susceptibility to ALS inhibitors herbicides, the DNA extraction was performed. Through RAPD analysis, it was possible to evaluate the genetic similarity among beggar-ticks accesses. In the whole analysis of the accesses, from 20 primers assessed, only 17 displayed polymorphism and amplified a total of 94 bands. Average genetic similarity was low (37%). Regression analysis evidenced that there is no relationship between genetic and geographic distance for the beggar-ticks accesses. Low general similarity among accesses evidences that resistance in the region is represented by selection of resistant individuals already existing in the population.

Index terms: *Bidens pilosa*, genetic similarity, resistance, hairy beggar-ticks, RAPD, ALS.

Introdução

Biótipos da planta daninha *Bidens pilosa* L., conhecida popularmente como picão-preto, têm sobrevivido às doses recomendadas de herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) (Ponchio, 1997; Christoffoleti, 2001; Hernandes, 2004). Esta enzima catalisa a produção dos aminoácidos

hidrofóbicos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina (Vidal & Merotto, 2001). O mecanismo de resistência aos inibidores da ALS, na maioria dos casos, é resultado de alteração no sítio-alvo do herbicida, que torna a enzima insensível (Vidal, 1997).

O surgimento de plantas daninhas resistentes deve-se, entre outros fatores, à prolongada utilização de herbicidas com mesmo mecanismo de ação. Deste modo,

biótipos sofrem elevada pressão de seleção com esses herbicidas (Winkler et al., 2002). Fatores inerentes à planta como frequência inicial do alelo de resistência, tipo de alelo (dominante ou semidominante) e número de genes responsáveis pela resistência, bem como fatores agronômicos de manejo, intensidade de uso e rotação de mecanismo de ação herbicida, estão relacionados à seleção de biótipos para resistência (Maxwell & Mortimer, 1994). No Brasil, um dos primeiros casos de resistência aos inibidores da ALS foi evidenciado com picão-preto (Ponchio, 1997).

A variabilidade genética é importante para a evolução de plantas daninhas (Silverstovn & Lovett Doust, 1993). As ervas daninhas, em geral, apresentam elevada variabilidade genética, exibindo, assim, potencial para adaptar-se ao manejo realizado para o seu controle (Holt & Hochberg, 1997). Alta variabilidade genética, em uma população de plantas daninhas, predispõe esta população à elevada frequência inicial do alelo de resistência; este é um dos fatores que contribuem com a rápida seleção de biótipos para a resistência aos herbicidas (Vargas et al., 2001).

Com o avanço na biologia molecular e principalmente depois do desenvolvimento da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR), diversas técnicas moleculares têm sido utilizadas para análise da variabilidade genética. Entre as disponíveis, uma das mais simples é a dos marcadores do tipo polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), em virtude do baixo custo e de não ser necessário conhecimento genético prévio da espécie (Milach, 1998). Por meio da técnica de RAPD, pode-se avaliar a estrutura e a diversidade genética em populações naturais e selecionadas de plantas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o grau de similaridade genética entre acessos da planta daninha picão-preto, suscetíveis e resistentes aos herbicidas inibidores da enzima de ALS, coletados a distâncias conhecidas, e avaliar a relação entre o coeficiente de similaridade genética e a distância geográfica desses acessos.

Material e Métodos

Sementes de 15 acessos de picão-preto foram coletadas em duas propriedades agrícolas no Paraná, nos municípios de Nova Laranjeiras (acessos iniciados pela letra N) e Pato Branco (acessos iniciados por A e P), em julho de 2004. Os acessos foram

coletados a distâncias geográficas conhecidas, nas propriedades. A partir de um ponto inicial de coleta em cada propriedade, denominado distância geográfica zero, foram coletadas sementes de uma única planta, ao acaso, medindo-se, com uma trena, a distância do ponto de coleta em relação ao ponto inicial (Tabela 1). Acessos dos grupos A e P, da mesma propriedade, foram coletados em áreas de lavoura de soja delimitadas por duas curvas de nível, distantes 30 m entre si.

As sementes coletadas foram levadas para a Fac. de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre, RS, onde foram semeadas em vasos com volume de 500 mL contendo, como substrato, areia:solo (1:1). Depois da emergência, foi realizado o desbaste, permanecendo duas plantas por vaso; essas plantas foram mantidas em casa de vegetação até atingirem o estágio de seis folhas. A temperatura média do ar, durante a condução do experimento, foi de aproximadamente 25°C e o período de luminosidade de 12 horas. O acesso P1 apresentou problemas de germinação, sendo posteriormente excluído dos acessos do grupo P; mesmo assim continuou marcando o primeiro ponto de coleta para os acessos da segunda área de coleta (P).

Tabela 1. Distâncias geográficas (m) dos pontos de coleta de acessos de picão-preto com indicação de suscetibilidade ou resistência a herbicidas inibidores da acetolactato sintase, em Nova Laranjeiras e Pato Branco, PR, em 2004.

| Acesso | Distância geográfica |
|-------------------|----------------------|
| Nova Laranjeiras | |
| N1 ⁽¹⁾ | 0,0 |
| N2 | 0,4 |
| N5 | 6,0 |
| N9 | 26,0 |
| N10 | 39,0 |
| N19 | 202,0 |
| Pato Branco | |
| | 1ª área |
| A1 | 0,0 |
| A3 | 8,0 |
| A4 | 16,0 |
| | 2ª área |
| P1 | 0,0 |
| P5 | 34,0 |
| P6 | 56,0 |
| P9 | 239,0 |
| P10 | 307,0 |
| P11 | 379,0 |

⁽¹⁾Acessos iniciados pela letra N apresentam indicação de suscetibilidade aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase, e acessos iniciados por A e P são indicados como resistentes a estes herbicidas.

Quando as plântulas de picão-preto atingiram o estágio de seis folhas, foram coletadas duas folhas mantidas em N líquido até a extração de DNA. A extração do DNA foi feita de acordo com Murray & Thompson (1980), utilizando tampão Tris-HCl 1M, pH 8,0, contendo EDTA 0,5M, NaCl 5M e 1,1% de CTAB. Proteinase K, SDS 20%, fenol, clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) e RNAs e foram utilizados para obter alta qualidade do DNA.

Uma prévia seleção de marcadores moleculares foi realizada, objetivando-se maior polimorfismo para os acessos de picão-preto (Hernandes, 2004). Vinte iniciadores da Operon Technologies (Alameda, CA) foram selecionados (Tabela 2). As reações de RAPD foram preparadas para um volume final de 25 µL, contendo a solução tampão da enzima Taq DNA polimerase (20 mM Tris-HCl e 50 mM KCl), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,24 µM de iniciador, 20 ng de DNA e 1,2 unidades da Taq DNA polimerase. As amplificações foram realizadas em um termociclador PTC-100 MJ Research, programado da seguinte forma: 94°C por 3 minutos, para desnaturação da fita de DNA, seguido de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 35°C e 2 minutos a 72°C. Uma etapa final de 10 minutos a 72°C foi incluída para extensão final dos fragmentos amplificados. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose a 1,5%, corados em brometo de etídio e visualizados em transluminador UV. Os tamanhos dos fragmentos foram determinados com a utilização do programa Kodak EDAS 290, comparando-se com padrão de peso molecular de 100 pares de base (DNA Ladder da Invitrogen).

A fim de confirmar a indicação de resistência ou suscetibilidade aos inibidores da ALS, depois da coleta das folhas para a extração de DNA, aspergiram-se as

plântulas com o herbicida de i.a. clorimurrom-etílico, na dose de 40 g ha⁻¹ (equivalente a duas vezes a dose recomendada do produto comercial). Para isso, utilizou-se pulverizador costal pressurizado com CO₂, munido de quatro bicos tipo leque, com pontas de 80.02 VS, volume de calda equivalente a 200 L ha⁻¹ e pressão de trabalho de 200 kPa. A aplicação foi realizada às 9h, quando a temperatura do ar era de 20°C e a umidade relativa do ar, de 75%. Avaliações foram realizadas aos 7, 14 e 28 dias depois da aplicação do tratamento herbicida.

A análise dos dados, nos géis, foi realizada de acordo com o sistema binário, usando 1 para a presença e 0 para a ausência de bandas. A similaridade genética entre os acessos foi estimada pelo coeficiente de Jaccard. No agrupamento dos dados e construção do dendrograma, foi utilizado o método da média das distâncias genéticas (UPGMA – Método de grupos por médias aritméticas), com o auxílio do programa NTSYSpc, versão 2.1 (Rohlf, 2000).

Resultados e Discussão

Todos os acessos de picão-preto com indicação de serem resistentes aos inibidores da ALS foram confirmados (acessos A e P); da mesma forma, os acessos com indicação de suscetibilidade, foram suscetíveis ao inibidor de ALS testado (acessos N). Entre os 20 iniciadores selecionados para marcador RAPD, 17 apresentaram polimorfismo, amplificando um total de 94 bandas, com tamanhos que variaram de 100 a 1.600 pb (Tabela 2). A análise conjunta dos acessos de picão-preto indicou baixa similaridade média (37%) (Figura 1).

Na análise de agrupamento hierárquico, os acessos de picão-preto foram separados em quatro grupos distintos: o primeiro, composto pelos acessos N1, N2,

Tabela 2. Seqüência de iniciadores utilizados como marcadores RAPD.

| Iniciador | Seqüência (5'-3') | Tamanho dos fragmentos (pb) | Iniciador | Seqüência (5'-3') | Tamanho dos fragmentos (pb) |
|-----------|-------------------|-----------------------------|-----------|-------------------|-----------------------------|
| OPP5 | CCCCGGTAAC | 400-800 | OPAD1 | CAAAGGGCGG | 250-1.200 |
| OPP6 | GTGGGCTGAC | 100-400 | OPAD8 | GGCAGGCAAG | 200-1.600 |
| OPP8 | ACATCGCCCA | 600-1.400 | OPAD10 | AAGAGGCCAG | 400-1.300 |
| OPP9 | GTGGTCCGCA | 800-1.100 | OPAD17 | GGCAAACCTT | 600-1.200 |
| OPP10 | TCCCGCCTAC | 300-1.400 | OPAD18 | ACGAGAGGCA | 400-600 |
| OPE9 | CTTCACCCGA | 300 | OPAI14 | TGACGGCGGT | 300-1.000 |
| OPE10 | CACCAGGTGA | 700-1.300 | OPAI19 | AATGCGGGAG | 200-1.600 |
| OPE11 | GAGTCTCAGG | - | OPAG1 | CTACGGAGGA | 300-800 |
| OPE12 | TTATCGCCCC | 400-1.100 | OPAG19 | GTCAGGGCAA | - |
| OPE13 | CCCGATTTCGG | 250-1.500 | OPAG20 | TCTCCCTCAG | - |

N5 e N9; o segundo, formado pelos acessos N10, N19, P6, P9, P10, P11, A3 e A4; o terceiro grupo, por A1; e o quarto, por P5. Não houve regressão significativa ($p > 0,05$) entre a distância genética e geográfica para os acessos de picão-preto avaliados (Figura 2).

Acessos de *Bidens* spp. resistentes aos inibidores da ALS, coletados em diferentes locais no Estado do Rio Grande do Sul, também mostraram baixa similaridade genética (27%) (Hernandes, 2004). Populações de *Euphorbia heterophylla* L. (leiteiro) de todo o País apresentaram similaridade genética média de 40% (Winkler et al., 2003). Esses resultados comprovam que, em geral, as espécies daninhas apresentam elevada variabilidade genética, possivelmente em virtude das condições adversas a que essas espécies estão sujeitas, uma vez que crescem em ambientes hostis. Tratando-se da resistência aos herbicidas, variabilidade genética elevada em uma população de plantas daninhas pode predispor-la à elevada frequência inicial do alelo de resistência, o que corresponde a um dos principais fatores que contribuem com a rápida seleção para resistência (Vargas et al., 2001). Para o grupo de herbicidas das triazinas, determinou-se frequência inicial do alelo

entre 10^{-10} e 10^{-20} plantas por hectare (Gressel, 1991). No entanto, para *Lolium rigidum* L., a frequência inicial do alelo para resistência aos inibidores da ALS equivale a 10^{-4} plantas (Preston & Powles, 2002).

No trabalho desenvolvido por Hernandes (2004), a possibilidade da ação do efeito fundador é discutida. O efeito fundador é definido como o estabelecimento de uma nova população por poucos indivíduos que carregam consigo somente uma pequena fração da variação genética total da população parental (Ridley, 2003). No caso de Hernandes (2004), haveria redução da variabilidade genética na população, em virtude da seleção para resistência aos herbicidas, que estaria ocorrendo entre indivíduos. Contudo, tanto em Hernandes (2004) quanto neste trabalho, a similaridade genética média entre os acessos de picão-preto foi baixa, indicando não haver, portanto, ação do efeito fundador, pela elevada variabilidade genética apresentada pelos acessos avaliados.

A análise do agrupamento hierárquico mostra similaridade entre acessos suscetíveis aos inibidores da ALS (grupo 1). Embora, no grupo 2, a maioria dos acessos seja resistente aos inibidores da ALS e apresente origem comum (provém da mesma

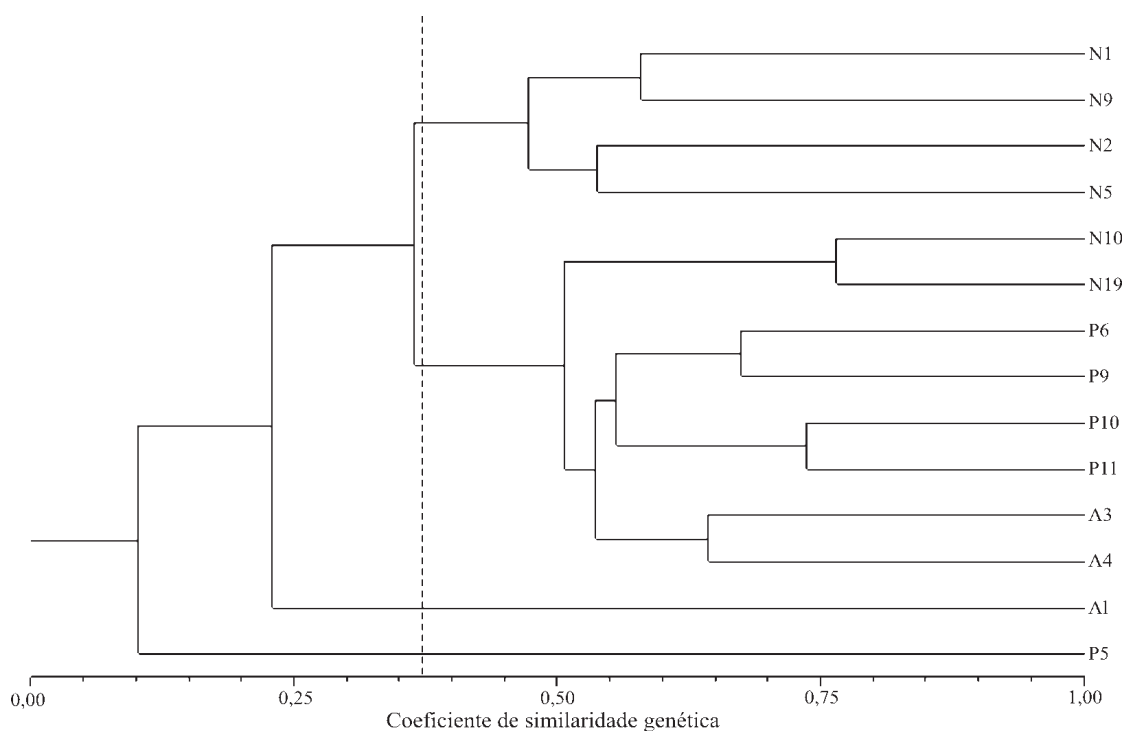


Figura 1. Dendrograma de acessos de picão-preto, resistentes (iniciados por A e P) e suscetíveis (iniciados por N) aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase, coletados a distâncias geográficas conhecidas. A linha pontilhada indica a similaridade genética média.

propriedade), há dois acessos provenientes de outro município, N10 e N19, os quais são suscetíveis aos herbicidas avaliados.

O fluxo gênico entre plantas pode ser reduzido ou bloqueado pela ocorrência de diversos tipos de barreiras, as quais funcionam como mecanismos de isolamento (Grant, 1977). A barreira reprodutiva impede a fecundação cruzada por meio do isolamento mecânico, em que as flores dos indivíduos apresentam estruturas diferenciadas, evitando a fecundação entre elas; a barreira reprodutiva pode ocorrer, ainda, pela diferença nas horas de liberação de pólen e na receptividade da parte feminina. Picão-preto, além de ser uma espécie autógama (Ballard, 1986), o que constitui uma barreira reprodutiva natural ao fluxo gênico, apresenta uma estrutura floral que favorece sua autofecundação. Assim, a barreira reprodutiva pode ter reduzido o fluxo gênico entre os acessos de picão-preto. Portanto, a maior similaridade apresentada entre dois acessos suscetíveis e aqueles resistentes, sob reduzido fluxo gênico, por meio do pólen, pode-se justificar pela fácil disseminação dos aquênios de picão-preto, por animais e máquinas agrícolas.

A baixa similaridade geral entre os acessos de picão-preto resistentes e suscetíveis aos inibidores da ALS

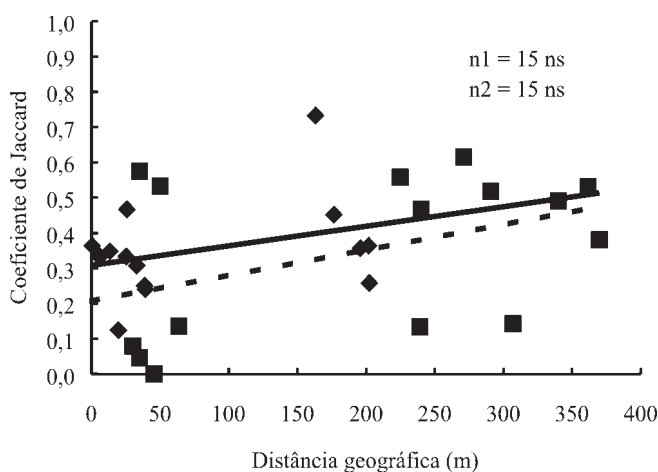


Figura 2. Regressão entre distância genética e geográfica avaliada entre acessos de picão-preto suscetíveis (◆ e —) e resistentes (■ e - -) aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase (n1 e n2 = número de pares de acessos avaliados para os acessos suscetíveis e resistentes, respectivamente; ns indica regressão não-significativa).

fornece evidências de que a resistência na região dos municípios Nova Laranjeiras e Pato Branco, no Estado do Paraná, está surgindo pela seleção de indivíduos resistentes preexistentes na população. Fatores agrônômicos de manejo como o uso intensivo de inibidores da ALS e ausência de rotação de herbicidas com mecanismos de ação diferenciados, estão relacionados à seleção de acessos de picão-preto para resistência.

A similaridade genética elevada entre indivíduos compõe grupamentos onde há maior probabilidade de ocorrer fluxo gênico por meio do pólen ou da semente (Grant, 1977). Não há correlação entre distância genética e geográfica, quando são analisados somente indivíduos suscetíveis ou somente os resistentes (Figura 2). A ocorrência de pares de indivíduos com coeficiente de Jaccard próximo a 80%, a uma distância geográfica aproximada de 170 m (Figura 2), permite deduzir que este é o diâmetro geográfico do grupamento de indivíduos.

Conclusões

1. A similaridade genética entre acessos de picão-preto resistentes e suscetíveis aos inibidores da enzima ALS, coletados no Estado do Paraná, é baixa, a distâncias conhecidas.
2. Não há relação entre variabilidade genética e distância geográfica para os acessos de picão-preto avaliados.

Agradecimentos

À Capes, ao CNPq e à Fapergs, pelo apoio à pesquisa.

Referências

- BALLARD, R. *Bidens pilosa* complex (Asteraceae) in North and Central America. **American Journal of Botany**, v.73, p.1452-1465, 1986.
- CHRISTOFFOLETI, P.J. Análise comparativa do crescimento de biótipos de picão-preto (*Bidens pilosa*) resistente e suscetível aos herbicidas inibidores da ALS. **Planta Daninha**, v.19, p.75-83, 2001.
- GRANT, V. **Organismic evolution**. San Francisco: W.H. Freeman, 1977. 418p.
- GRESSEL, J. Why get resistance? It can be prevented or delayed. In: CASELEY, J.C.; CUSSANS, G.W.; ATKIN, R.K. **Herbicide resistance in weeds and crops**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1991. p.1-25.

- HERNANDES, G.C. **Resistência de *Bidens* spp. aos herbicidas inibidores de acetolactato sintase**: análise de populações com marcadores moleculares e estratégias para seu manejo. 2004. 109p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- HOLT, R.D.; HOCHBERG, M.E. When is biological control evolutionarily stable (or is it?). **Ecology**, v.78, p.1673-1683, 1997.
- MAXWELL, B.D.; MORTIMER, A.M. Selection for herbicide resistance. In: POWLES, S.B.; HOLTUM, J.A.M. (Ed.). **Herbicide resistance in plants**: biology and biochemistry. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. p.1-20.
- MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141p.
- MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v.8, p.4321-4325, 1980.
- PONCHIO, J.A.R. **Resistência de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase**. 1997. 139p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- PRESTON, C.; POWLES, S.B. Evolution of herbicide resistance in weeds: initial frequency of target site-based resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. **Heredity**, v.88, p.8-13, 2002.
- RIDLEY, M. **Evolution**. Oxford: Blackwell, 2003. 768p.
- ROHLF, F.J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Port Jefferson: Applied Biostatistics, 2000. 38p.
- SILVERSTOWN, J.W.; LOVETT DOUST, J. **Introduction to plant population ecology**. Oxford: Blackwell Scientific, 1993. 102p.
- VARGAS, L.; BORÉN, A.; SILVA, A.A. Herança da resistência aos herbicidas inibidores de ALS em biótipos de *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, v.19, p.331-336, 2001.
- VIDAL, R.A. **Herbicidas**: mecanismo de ação e resistência de plantas. Porto Alegre: Ed. do Autor, 1997. 165p.
- VIDAL, R.A.; MEROTTO JUNIOR, A. **Herbicidologia**. Porto Alegre: Ed. dos Autores, 2001. 152p.
- WINKLER, L.M.; VIDAL, R.A.; BARBOSANETO, J.F. Aspectos genéticos envolvidos na resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Plantio Direto**, v.70, p.21-24, 2002.
- WINKLER, L.M.; VIDAL, R.A.; BARBOSA NETO, J.F. Caracterização genética de *Euphorbia heterophylla* resistente a herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.1067-1072, 2003.

Recebido em 22 de setembro de 2005 e aprovado em 17 de fevereiro de 2006