

USO DA ELETROFORESE DE ISOENZIMAS PARA AVALIAÇÃO DA COMPETITIVIDADE DE BIOTIPOS DE TIRIRICA¹

CARLOS A. R. SILVA², EDIVALDO D. VELIN³, EDSON S. MORI³ e DAGOBERTO MARTINS³

RESUMO

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar, por meio de eletroforese de isoenzimas, em casa de vegetação, a competitividade dos biotipos de tiririca (*Cyperus rotundus* L.) mais freqüentes que ocorrem no estado de São Paulo. Dos quatorze sistemas enzimáticos testados, seis apresentaram polimorfismo (α e β -EST, ACP, IDH, MDH e SKDH) e foram utilizados para a identificação das 66 amostras coletadas, classificando-as em 10 biotipos de *Cyperus rotundus*. Durante a amostragem, foram identificadas as espécies *C. flavus*, *C. iria* e *C.*

esculentus. Foram identificados diferentes biotipos de *C. rotundus*, com diferentes freqüências de ocorrência no estado de São Paulo. Houve predominância de dois biotipos, que estiveram presentes em 48,5% e 21,2% dos pontos de amostragem. Os diferentes biotipos de *C. rotundus* mostraram-se distintos em termos de competitividade intra-específica. Os biotipos mais competitivos foram os mais freqüentes nas avaliações de campo.

Palavras chave: Planta daninha, biotipo, *Cyperus rotundus*.

ABSTRACT

Isoenzyme evaluation of intra-specific competitiveness of purple nutsedge biotypes

The objective of this research was to evaluate intra-specific competition ability of purple nutsedge *Cyperus rotundus* biotypes, using isoenzymes. We sampled weed populations in 66 sites all around São Paulo State - Brazil. Polymorphism was observed in six out of fourteen enzymatic systems studied (α and β -EST, ACP, IDH, MDH, and SKDH). Polymorphism was not observed for ADH, CAT, GDH, AAT, LAP, MADH, PER, and SDH. Using the information of

the six polymorphic isoenzymes, it was possible to identify 10 biotypes of *Cyperus rotundus* and *C. flavus*, *C. iria* e *C. esculentus* species. The two major biotypes were predominant in 48.5% and 21.2% of the sampling sites. The competition ability assay was carried out showing that the most widely spread biotypes were the most competitive ones.

Key words: Electrophoresis, weed, biotypes, competition, *Cyperus rotundus*.

INTRODUÇÃO

A tiririca (*Cyperus rotundus* L.) é considerada a planta daninha mais disseminada e nociva de todo o mundo. Além de sua grande capacidade competitiva, exerce um efeito alelopático importante sobre a brotação de diversas culturas, principalmente na cana-de-

açúcar (Lorenzi, 1991). Para uma estratégia de controle da planta daninha ser bem planejada são necessárias informações mais detalhadas sobre os biotipos existentes e sua distribuição geográfica. Portanto, a biotipagem e as avaliações da competitividade de cada biotipo são de extrema importância para que os métodos de controle possam ser corretamente utilizados. Vários

¹ Recebido para publicação em 16/03/99 e na forma revisada em 25/09/99.

² Eng^o Agr^o Doutor em Agricultura, Agroflora. C.P. 427, CEP: 12900-000, Bragança Paulista/SP.

³ Prof^o Dr., Dept^o de Produção Vegetal. C.P. 237, CEP: 18603-970, Botucatu/SP.

métodos podem ser utilizados para esta biotipagem. Porém, os métodos mais confiáveis são aqueles baseados em biologia molecular, como a eletroforese de isoenzimas, DNA e RNA. As técnicas eletroforéticas são bastante utilizadas para a identificação de espécies e biotipos e é uma ferramenta bastante útil na sistemática de plantas e em estudos sobre a evolução das espécies (Gottlieb, 1977).

Diversos trabalhos já foram realizados para a caracterização de variedades e espécies daninhas. Porém, o único trabalho específico com *Cyperus* é o de Horak & Holt (1986) que trabalharam com variabilidade isoenzimática em populações de *Cyperus esculentus* de dez localidades da Califórnia. Os pesquisadores avaliaram 20 locos de oito sistemas enzimáticos (ADH - Álcool desidrogenase, PGM, TPI - Triose fosfato isomerase, PGI, IDH - Isocitrato desidrogenase, MDH, 6-PGD - 6-Fosfogluconato desidrogenase e ACP - Fosfatase ácida) e observaram que oito foram monomórficos e somente quatro locos demonstraram variabilidade. Os resultados demonstraram que as dez populações de *C. esculentus* analisadas tiveram pequena variação nos locos examinados e algumas populações demonstraram uma completa falta de variação entre plantas.

A presente pesquisa visou avaliar, em casa de vegetação, por meio da eletroforese de isoenzimas, a competitividade dos biotipos de tiririca, que ocorrem em diferentes culturas no estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada nos laboratórios do Departamento de Produção Vegetal, da Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP - Câmpus de Botucatu e na Fazenda Experimental da Agroflora S/A - Reflorestamento e Agropecuária.

Para a obtenção dos biotipos de tiririca, foi realizada uma coleta de material vegetativo em diversas culturas e regiões do estado de São Paulo. Estes materiais coletados foram devidamente catalogados e mantidos em casa de vegetação. Na

Tabela 1, podemos observar as regiões e as culturas onde foram coletados os biotipos.

Visando avaliar a diversidade genética dentro de uma mesma região, coletou-se em algumas áreas agrícolas mais importantes, mais de uma amostra (geralmente cinco) e nas outras regiões apenas uma.

O tipo de gel utilizado foi o de amido (amido de batata hidrolizado da SIGMA). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi o Citrato-morfolina CM (Clayton & Tretiak, 1972).

Dos 14 sistemas enzimáticos utilizados para a identificação dos diferentes biotipos de tiririca 6 foram sistemas polimórficos utilizados: α -EST, β -EST, ACP, IDH, MDH e SKDH.

Após a devida identificação dos biotipos, foram selecionados os mais frequentes (biotipos 1, 2, 3 e 5) e conduziu-se um ensaio de competitividade em casa-de-vegetação, no qual, confrontou-se estes biotipos entre si, plantando-se em caixas de amianto de 50 litros, em fileiras alternadas, quantidades semelhantes de propágulos de dois biotipos (10 propágulos de cada). Os materiais de propagação utilizados foram mudas, que apresentavam parte aérea e sistema radicular podados, deixando-se apenas 3cm de raiz e parte aérea. Utilizou-se esta poda para igualar as mudas de tamanhos diferentes.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. Foi realizada uma avaliação com quatro meses após a instalação do experimento. Nesta avaliação, o conteúdo das caixas foi analisado, através de eletroforese, para verificar a frequência dos diferentes biotipos na população, após este período de convivência. Os biotipos com maior frequência após este período de convivência foram considerados mais competitivos. Os tratamentos utilizados no ensaio de competição encontram-se detalhados na Tabela 2.

Visando padronização, utilizou-se a amostra de uma localidade como representante do biotipo. Esta escolha foi baseada na quantidade de propágulos destas amostras; escolhendo-se as amostras com maior quantidade de propágulos. Na Tabela 3, encontram-se discriminadas as amostras escolhidas para cada biotipo.

TABELA 1. Relação de localidades e culturas onde foram retirados materiais de tiririca no estado de São Paulo.

Numeração	Localidade	Cultura
1	Americana	cana-de-açúcar
2	Piracicaba	cana-de-açúcar
3	Indaiatuba	maracujá
4	Vinhedo	figo
5	Piracicaba	cana-de-açúcar
6	Cordeirópolis	citrus
7	Santa Bárbara D'Oeste	cana-de-açúcar
8	Vinhedo	cana-de-açúcar
9	Lins	cana-de-açúcar
10	Pirajuí	cana-de-açúcar
11	Lençóis Paulista	cana-de-açúcar
12	Campinas	citrus
13	Penápolis	cana-de-açúcar
14	Auriflama	algodão
15	Araçatuba	cana-de-açúcar
16	Jales	uva Itália
17	Jundiai	hortaliças
18	São José do Rio Preto	cana-de-açúcar
19, 20 e 22	São José do Rio Preto	citrus
21	São José do Rio Preto	café
23	Catanduva	cana-de-açúcar
24	Taquaritinga	citrus
25	Araraquara	cana-de-açúcar
26	Corumbataí	cana-de-açúcar
27	Orlândia	cana-de-açúcar
28, 30,31 e 32	Ribeirão Preto	cana-de-açúcar
29	Ribeirão Preto	café
33	São Simão	cana-de-açúcar
34	Porto Ferreira	cana-de-açúcar
35	Leme	algodão
32	Ribeirão Preto	cana-de-açúcar
33	São Simão	cana-de-açúcar
34	Porto Ferreira	cana-de-açúcar
35	Leme	algodão
36, 37, 38, 39 e 40	Jaboticabal	cana-de-açúcar
41	Bebedouro	citrus
42	Guaíra	soja
43, 44, 45,e 46	Guaíra	milho
47	Capão Bonito	feijão
48	Itapetininga	milho
49	Tatuí	milho
50	Tietê	cana-de-açúcar
51, 52 e 53	Piracicaba	cana-de-açúcar
54	Mogi-Mirim	feijão
55	Ourinhos	milho
56	Santa Cruz do Rio Pardo	milho
57	Assis	cana-de-açúcar
58	Rancharia	cana-de-açúcar
59	Águas de Santa Bárbara	cana-de-açúcar
60	Presidente Prudente	cana-de-açúcar
61, 62 e 63	Botucatu	cana-de-açúcar
64	Botucatu	citrus
65	Botucatu	tomate
66	Jaú	cana-de-açúcar

TABELA 2. Tratamentos utilizados na instalação do ensaio de competição.

Biotipos confrontados	Tratamentos
1 x 2	1
1 x 3	2
1 x 5	3
2 x 3	4
2 x 5	5
3 x 5	6

TABELA 3. Amostras utilizadas como representantes dos biotipos no ensaio de competição.

Biotipo	Amostra	Região de Coleta	Cultura
1	36	Jaboticabal	cana-de-açúcar
2	52	Piracicaba	cana-de-açúcar
3	19	São José do Rio Preto	citrus
5	11	Lençóis Paulista	cana-de-açúcar

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Baseando-se nos diferentes padrões de bandas apresentados na Tabela 4, esquematizou-se a Tabela 5, onde são apresentados os

zimogramas de cada material de tiririca coletado no Estado de São Paulo, determinando-se os indivíduos com mesmo padrão de bandas isoenzimáticas em seu respectivo biotipo.

TABELA 4. Zimogramas encontrados para cada sistema enzimático.

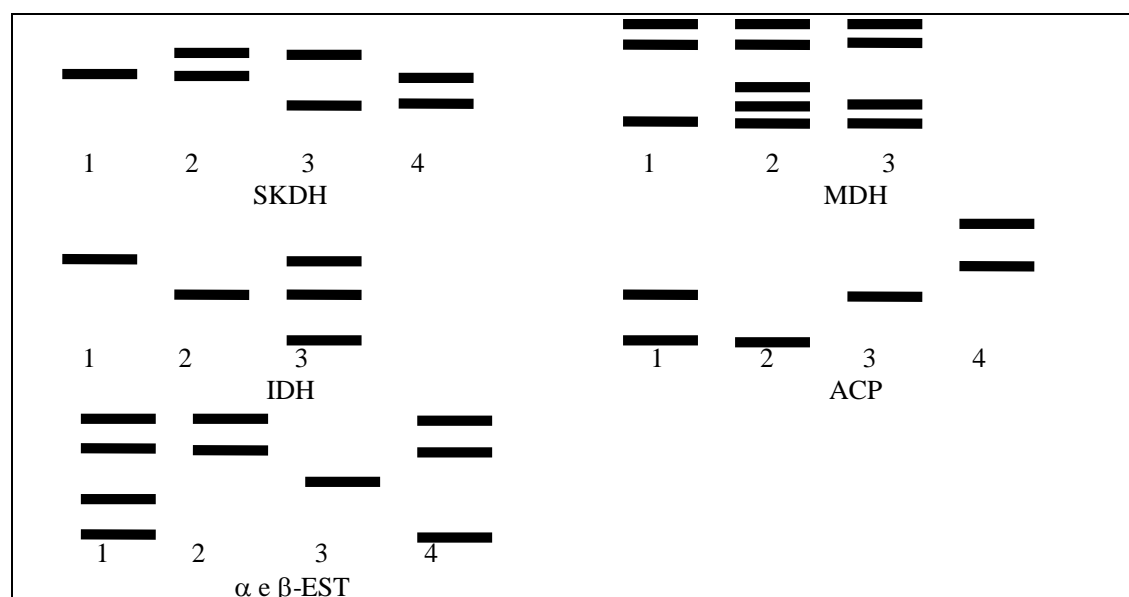


TABELA 5. Padrões de bandas isoenzimáticas de cada material coletado.

Amostras/locais	Sistemas Enzimáticos						Biotipos
	SKDH	MDH	IDH	ACP	α -EST	β -EST	
1	1	2	1	1	1	1	1
2	1	2	1	1	1	1	1
3	2	2	1	1	1	1	2
4	2	2	1	1	1	1	2
5	1	1	1	1	3	3	3
6	1	1	2	1	3	3	4
7	1	1	1	1	1	1	5
8	1	1	1	1	1	1	5
9	1	1	1	1	1	1	5
10	1	1	1	1	1	1	5
11	1	1	1	1	1	1	5
12	1	1	1	1	1	1	5
13	1	1	2	1	3	3	4
14	3	1	1	1	3	3	6
15	1	1	1	1	1	1	5
16	1	2	1	1	1	1	1
17	1	1	1	1	1	1	5
18	1	1	1	1	1	1	5
19	1	1	1	1	3	3	3
20	1	2	1	1	1	1	1
21	1	2	1	1	1	1	1
22	1	2	1	1	1	1	1
23	1	1	1	1	1	1	5
24	1	1	1	1	1	1	5
25	1	2	1	1	1	1	1
26	1	2	1	1	1	1	1
27	1	2	1	1	1	1	1
28	1	1	1	1	1	1	5
29	1	1	1	1	1	1	5
30	1	1	1	1	1	1	5
31	1	1	1	1	1	1	5
32	1	1	1	1	1	1	5
33	1	2	1	1	1	1	1
34	1	1	1	1	1	1	5
35	1	1	1	1	1	1	5
36	1	2	1	1	1	1	1
37	1	2	1	1	1	1	1
38	1	1	1	1	1	1	5
39	1	2	1	1	1	1	1
40	1	1	1	1	1	1	5
41	1	2	1	1	1	1	1
42	1	1	1	1	1	1	5

TABELA 5. Continuação...

Amostras/locais	Sistemas Enzimáticos						Biotipos
	SKDH	MDH	IDH	ACP	α -EST	β -EST	
43	1	1	1	1	1	1	5
44	1	1	1	1	1	1	5
45	1	1	1	1	1	1	5
46	1	1	1	1	1	1	5
47	2	2	1	1	1	1	2
48	1	1	1	1	1	1	5
49	2	1	1	1	1	1	7
50	1	1	1	1	1	1	5
51	1	1	1	1	1	1	5
52	2	2	1	1	1	1	2
53	2	2	1	1	1	1	2
54	3	1	1	3	1	1	8
55	1	1	1	1	2	2	9
56	1	1	1	1	1	1	5
57	3	2	1	1	1	1	10
58	3	2	1	1	1	1	10
59	4	3	1	3	1	1	11
60	1	1	1	1	1	1	5
61	1	2	1	2	1	1	12
62	1	1	1	1	1	1	5
63	2	3	3	4	4	4	13
64	3	2	1	1	1	1	10
65	3	2	1	1	1	1	10
66	1	1	1	1	1	1	5

Pela análise dos padrões de bandas da Tabela 5, verifica-se a distinção de 13 biotipos. Estes biotipos e a frequência em que ocorreram encontram-se detalhados na Tabela 6.

Através de análises morfológicas, verificou-se que três outros biotipos identificados, pertencem à outras espécies de tiririca. As amostra 59, 61 e 63 pertencem às espécies *Cyperus flavus* (Vahl) Nees, *Cyperus iria* L. e *Cyperus esculentus* L., respectivamente. A identificação das espécies foi feita segundo Kissmann (1991) e Bacchi (1984).

Verifica-se que o biotipo 1, que é o segundo mais freqüente (21,2%), encontra-se disseminado pela região Noroeste e Norte do

Estado de São Paulo (regiões abrangendo as cidades de Ribeirão Preto, São José do Rio Preto, Americana e Jales).

O biotipo 5, o mais freqüentemente encontrado (48,5%), está disseminado nas regiões de Campinas, Jundiaí, Santa Bárbara d'Oeste e Vinhedo, abrangendo ainda a região Centro-Sul do Estado indo até Lins, Pirajuí, Lençóis Paulista e Araçatuba e avança para a região Norte, a região de Ribeirão Preto (com cinco ocorrências), Taquaritinga, Catanduba e São José do Rio Preto. O biotipo 7 foi encontrado somente em Tatuí (frequência de 1,5%) e o 9 somente em Ourinhos (frequência de 1,5%), ocorrida dentro do biotipo

cinco. O biotipo 6 encontra-se disseminado em Auriflama.

Os resultados do ensaio de competição encontram-se na Tabela 7.

TABELA 6. Biotipos identificados pelo tampão Citrato-morfolina (CM).

Biotipo/Espécie	Material Amostrado	Frequência
1	1, 2, 16, 20, 21, 22, 25, 26, 27, 33, 36, 37, 39 e 41	21,2%
2	3, 4, 47, 52 e 53	7,6%
3	5 e 19	3,0%
4	6 e 13	3,0%
5	7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 17, 18, 23, 24, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 38, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 48, 50, 51, 56, 60, 62 e 66	48,5%
6	14	1,5%
7	49	1,5%
8	54	1,5%
9	55	1,5%
10	57, 58, 64 e 65	6,1%
<i>Cyperus flavus</i>	59	1,5%
<i>Cyperus iria</i>	61	1,5%
<i>Cyperus esculentus</i>	63	1,5%

TABELA 7 -Frequência dos biotipos dominantes no ensaio de competição.

Tratamentos	Biotipos em competição	Biotipo c/menor frequência	Frequência (%)	Número médio de amostras
1	1 x 2	1	73,9	9,25
2	1 x 3	1	73,3	9,00
3	1 x 5	1	85,4	8,50
4	2 x 3	3	87,9	9,25
5	2 x 5	5	76,3	8,00
6	3 x 5	5	89,3	6,00

De acordo com os resultados da Tabela 7, o biotipo mais competitivo seria o número 1, sendo o mais freqüente em todos os tratamentos nos quais estava presente, com uma freqüência média de 77,5%. Em seguida temos o biotipo 5 que foi mais freqüente em dois dos três tratamentos em que participou; apresentando uma freqüência média de 82,8%. O biotipo 3 foi mais

freqüente somente quando contrastado com o biotipo 2, com uma freqüência de 87,9%. Apresentando-se como o menos competitivo nas condições deste experimento, encontra-se o biotipo dois, que foi menos competitivo frente aos demais biotipos. Estes resultados confirmam os dados obtidos durante a coleta destes materiais, que apresentaram resultados semelhantes na

prática. Os biotipos 5 e 1 foram os mais freqüentemente encontrados nas coletas realizadas no estado de São Paulo; apresentando freqüências de 48,5% e 21,2%, respectivamente.

Assim, os seis sistemas enzimáticos polimórficos estudados (α e β -EST, ACP, IDH, MDH e SKDH) classificaram 10 diferentes biotipos de *Cyperus rotundus* no Estado de São Paulo, além de separar as espécies *C. flavus*, *C. iria* e *C. esculentus*. Além de ser possível identificar diferentes biotipos, com diferentes freqüências de ocorrência no Estado de São Paulo, havendo predominância de dois biotipos, que estiveram presentes em 48,5% e 21,2% dos pontos de amostragem e os diferentes biotipos de *C. rotundus* mostraram-se distintos em termos de competitividade intra-específica, sendo os biotipos mais competitivos os que mais freqüentes foram encontrados nas avaliações de campo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP pelo apoio financeiro recebido, para a realização deste estudo.

LITERATURA CITADA

- ACQUAAH, G. **Practical protein electrophoresis for genetic research**. Portland, Oregon: Dioscorides Press, 1992. 131p.
- ALFENAS, A.C., PETERS, I., BRUNE, W., PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991. 242p.
- BACCHI, O., LEITÃO FILHO, H.F., ARANHA, C. **Plantas invasoras de culturas**: v.3. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1984. p.602-906.
- CLAYTON J.W., TRETIK, D.N. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. **J. Fisheries Res. Board Canada**, v. 29, n. 8, p. 1169-1172, 1972.
- GOTTLIEB, L.D. Eletrophoretic evidence and plant systematics. **An. Mo. Bot. Gard.**, v.64, p.161-180, 1977.
- HORAK, M.J., HOLT, J.S. Isozyme variability and breeding systems in populations of yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*). **Weed Sci.**, v.34, p.538-543, 1986.
- KISSMANN, K.G. **Plantas infestantes e nocivas**: v.1. BASF Brasileira S/A, 1991. 608p.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. 2ª ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1991. 440p.
- SOLTIS, D.E., SOLTIS, P.S. **Isozymes in plant biology: advances in plant sciences series** v.4. Portland, Oregon: Dioscorides Press, 1989. 268p.