

## SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE *Bidens pilosa* RESISTENTES AOS HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS<sup>1</sup>

*Genetic Similarity among Bidens pilosa Accesses Resistant to ALS-Inhibiting Herbicides*

VIDAL, R.A.<sup>2</sup>, LAMEGO, F.P.<sup>3</sup>, RESENDE, L.V.<sup>4</sup>, DA-SILVA, P.R.<sup>5</sup>, DELATORRE, C.A.<sup>2</sup> e TREZZI, M.M.<sup>6</sup>

RESUMO - Herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) têm sido amplamente utilizados no controle da planta daninha picão-preto (*Bidens pilosa*). A pressão de seleção causada pelo uso intensivo desses herbicidas tem selecionado biótipos de picão-preto resistentes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o grau de similaridade genética entre acessos de picão-preto resistentes aos herbicidas inibidores da ALS, bem como a relação entre coeficiente de similaridade genética e distância geográfica desses acessos. Para isso, sementes de dois grupos de acessos de picão-preto, originárias de uma propriedade em Pato Branco, Paraná, resistentes aos herbicidas inibidores da ALS foram colhidas, e plântulas foram cultivadas em casa de vegetação na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, em outubro de 2004. Por meio do marcador molecular RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) foi possível avaliar a similaridade genética entre os acessos de picão-preto. Na análise conjunta dos acessos, dos 20 primers utilizados, 17 apresentaram-se polimórficos, amplificando um total de 94 bandas. Houve baixa similaridade genética (38%) entre acessos de picão-preto resistentes aos herbicidas inibidores da ALS originários de uma mesma propriedade. Não foi observada relação entre distância genética e distância geográfica entre os acessos avaliados.

**Palavras-chave:** resistência, picão-preto, variabilidade genética.

ABSTRACT - Acetolactate synthase (ALS)-inhibiting herbicides have been widely used to control the weed hairy beggarticks (*Bidens pilosa*). The selection pressure caused by intensive herbicide use has selected hairy beggarticks resistant biotypes. The objectives of this work were to evaluate the degree of genetic similarity among hairy beggarticks accesses (*Bidens pilosa*) resistant to ALS-inhibiting herbicides, and to evaluate the relation between genetic similarity and geographic distance. Seeds of two groups of hairy beggarticks accesses resistant to ALS-inhibitors were sampled from a farm at Pato Branco, Paraná, and seedlings were grown in the greenhouse at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, in October/2004. The use of RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) molecular markers allowed evaluating the genetic similarity among hairy beggarticks accesses. In the analysis of both access groups, out of twenty primers assessed, only seventeen displayed polymorphism and amplified a total of 94 bands. There is low genetic similarity (38%) among hairy beggarticks accesses resistant to ALS inhibitors from the same farm. There is no relationship between genetic distance and geographic distance in the evaluated accesses.

**Key words:** resistance, hairy beggarticks, genetic variability.

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 22.3.2005 e na forma revisada em 5.9.2005.

<sup>2</sup> Eng.-Agr., Ph.D., Professor(a) do Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia, UFRGS, Caixa Postal 15100, 91501-970 Porto Alegre-RS, <ribas.vidal@ufrgs.br>; <sup>3</sup> Eng.-Agr<sup>a</sup>, M.S., aluna do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRGS. <sup>4</sup> Eng.-Agr<sup>a</sup>, D.S., Prof<sup>a</sup>. do Dep. de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE; <sup>5</sup> Biólogo, M.S., aluno do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – CBIOT/UFRGS. <sup>6</sup> Eng.-Agr., D.S., Professor Adjunto do Curso de Agronomia do CEFET/PR, Unidade de Pato Branco.



## INTRODUÇÃO

A planta daninha *Bidens pilosa*, conhecida popularmente por picão-preto, é uma espécie nativa da América Tropical e encontra-se distribuída em todas as regiões do Brasil, infestando a maioria das culturas anuais de verão. No sul do país, é uma importante infestante em lavouras de soja, podendo resultar em elevadas perdas de rendimento. Até a densidade de 15 plantas m<sup>-2</sup> de picão-preto, foi observado que o acréscimo de cada planta da erva aumentou em 2,1% a perda de rendimento de grãos da soja (Rizzardi et al., 2003).

Herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) têm sido amplamente utilizados no controle de picão-preto. Conseqüentemente, o uso intensivo de herbicidas com esse mecanismo de ação tem selecionado biótipos de picão-preto resistentes. A resistência é causada pela falta de sensibilidade da enzima ALS à ação dos herbicidas que atuam inibindo sua atividade. A falta de sensibilidade desta enzima resulta da substituição de seus aminoácidos (Vidal, 1997).

A variabilidade genética é um requisito para a evolução, o sucesso no estabelecimento e a dispersão de plantas daninhas (Silverstow & Lovett Doust, 1993). Em geral, as espécies daninhas apresentam elevada variabilidade genética entre plantas de uma população ou entre populações, com potencial para se adaptar ao manejo empregado no seu controle (Holt & Hochberg, 1997). Elevada variabilidade genética em uma população de plantas daninhas pode predispor-la à elevada frequência inicial do alelo de resistência, sendo este um dos principais fatores que contribuem para a rápida seleção de biótipos resistentes aos herbicidas (Vargas et al., 1999).

Com o desenvolvimento da biologia molecular, após o advento da “reação em cadeia de polimerase (PCR)”, diversas técnicas têm sido desenvolvidas para detectar a variabilidade genética. Entre aquelas disponíveis, uma das mais simples é a de RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), com facilidade de uso, rapidez e baixo custo (Milach, 1998). Por meio de marcadores RAPD pode-se avaliar a estrutura e a diversidade genética em populações naturais e populações melhoradas. Em *Echinochloa crusgalli* (capim-arroz), essa

técnica foi utilizada para detectar diferenças na tolerância ao herbicida quinclorac (Rutledge et al., 2000). Também em picão-preto, a similaridade genética entre acessos resistentes aos herbicidas inibidores da ALS foi avaliada por RAPD (Hernandes, 2004).

Os objetivos deste trabalho foram verificar o grau de similaridade genética entre acessos de picão-preto, resistentes aos herbicidas inibidores da ALS, e avaliar a relação entre sua similaridade genética e distância geográfica.

## MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de nove acessos de picão-preto, suspeitos de resistência aos inibidores da ALS, foram coletadas em uma propriedade agrícola de Pato Branco, Paraná, em julho de 2004, a distâncias geográficas conhecidas. Foram definidas duas áreas de coleta, constituindo dois grupos de acessos – o primeiro com três (A) e o segundo com seis (P) indivíduos –, os quais foram coletados em áreas de lavoura de soja delimitadas por duas curvas de nível, distantes 30 m entre si. A partir de um ponto inicial (distância geográfica zero) foram colhidas sementes de um indivíduo ao acaso, medindo-se com uma trena a distância do ponto de coleta em relação ao ponto inicial (Tabela 1).

As sementes coletadas foram trazidas para a UFRGS, Porto Alegre, RS, onde foram semeadas em vasos com volume de 500 mL, tendo como substrato areia:solo (1:1). Após a emergência, realizou-se o desbaste, colocando-se duas plantas por vaso, mantidas em casa de vegetação até atingirem o estágio de seis

**Tabela 1** - Distâncias geográficas dos pontos de coleta de acessos de picão-preto. Pato Branco-PR, 2004

Acessos da 1ª área	Distância geográfica (m)
A1	0
A3	7
A4	16
Acessos da 2ª área	Distância geográfica (m)
P1	0
P5	34
P6	56
P9	239
P10	307
P11	379



folhas. A temperatura média do ar foi de aproximadamente 25 °C e o período de luminosidade de 12 horas. O acesso P1, por problemas de germinação, foi descartado, ainda que servisse de referência como primeiro ponto de coleta na segunda área (P).

Quando as plântulas de picão-preto atingiram o estágio de seis folhas, coletaram-se duas folhas delas, as quais foram mantidas em nitrogênio líquido até a extração do DNA, que foi baseada no protocolo proposto por Murray & Thompson (1980) (Tris-HCl 1M pH 8,0; EDTA 0,5M; NaCl 5M; e 1,1% de CTAB – brometo de cetiltrimetilamônio). Outros reagentes, como proteinase K, SDS 20%, fenol, clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v) e RNase, 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 *primers* provenientes 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 de MgCl<sub>2</sub>, 0,24 µM de *primer*; 20 ng de DNA e 1,2 unidade da enzima Taq DNA polimerase. As amplificações foram feitas em um termociclador PTC100 MJ Research, programado da seguinte forma: 94 °C por 3 minutos (min), para desnaturação da fita de DNA, seguido de 1 min a 94 °C, 1 min a 35 °C e 2 min a 72 °C. Um passo final de 10 min a 72 °C foi incluído, 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 o padrão de peso molecular de 100 pares de base (DNA Ladder (Invitrogen)).

Para confirmar a suspeita de resistência dos acessos de picão-preto aos inibidores da ALS, após a coleta das folhas para a extração de DNA, aspergiram-se as plântulas com o herbicida chlorimuron (Classic), na dose de 40 g ha<sup>-1</sup> (equivalente a 2x a dose recomendada). Para isso, utilizou-se pulverizador

costal pressurizado com CO<sub>2</sub>, munido de quatro bicos tipo leque, com pontas de 80.02 VS, com volume de calda equivalente a 200 L ha<sup>-1</sup> e pressão de trabalho de 200 kPa. A aplicação foi feita às 9 horas, quando a temperatura do ar era de 20 °C e a umidade relativa do ar de 75%. As avaliações foram realizadas aos 7, 14 e 28 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT).

A análise dos dados nos géis foi feita 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. Para agrupamento dos dados e construção do dendrograma foi utilizado o método da média das distâncias genéticas (UPGMA – Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Means), com o auxílio do programa NTSYSpc versão 2.1 (Rohlf, 2001). Foi realizada regressão entre a distância geográfica entre os pontos de coleta das sementes e a respectiva variabilidade genética calculada através do coeficiente de Jaccard. Nesta regressão, compararam-se todas as combinações de pares de acessos entre si (n=28).

**Tabela 2** - Sequência de *primers* utilizados como marcadores RAPD

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



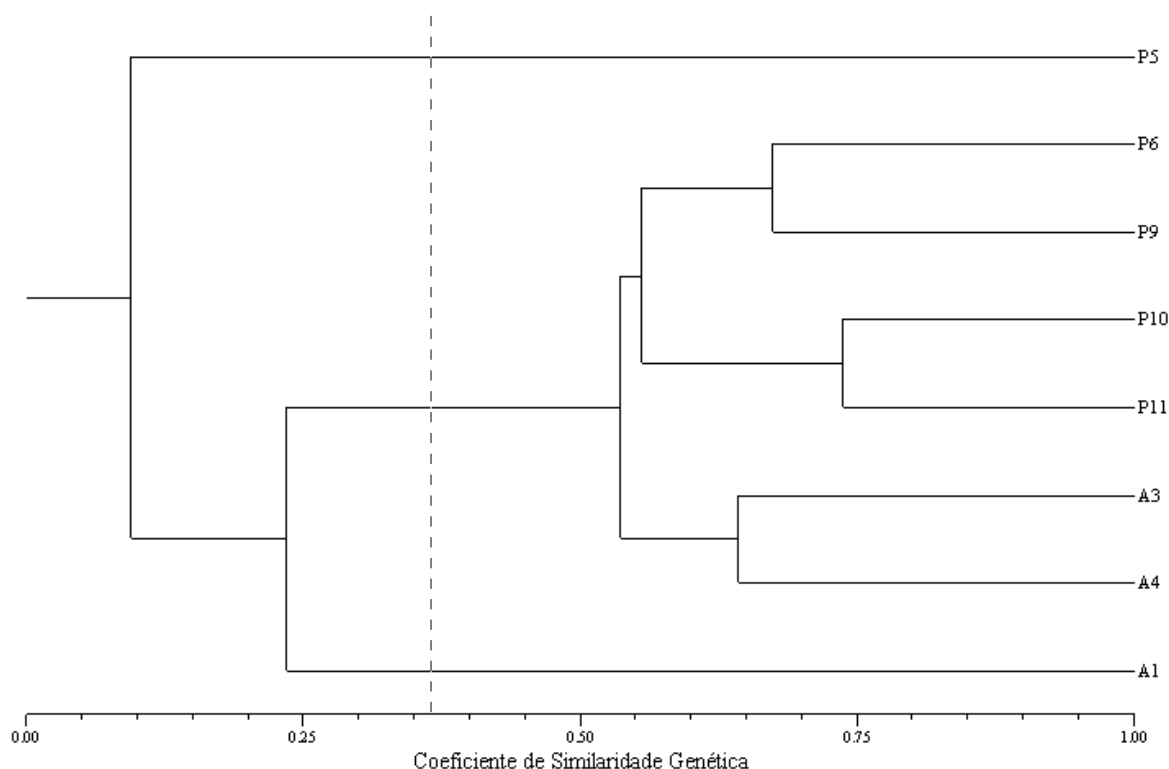
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os acessos de picão-preto avaliados foram confirmados como resistentes ao herbicida inibidor da ALS testado. Dos 20 *primers* selecionados inicialmente, 15 apresentaram polimorfismo para os acessos A de picão-preto, produzindo ampliações que resultaram em 79 bandas, com tamanhos que variaram de 100 a 1.600 pb. A análise conjunta dos três acessos A de picão-preto indicou similaridade média de 33% (dados não mostrados). Para os acessos P de picão-preto, 17 *primers* foram polimórficos, produzindo 89 bandas com tamanhos que variaram de 100 a 1.600 pb. A análise conjunta dos cinco acessos P de picão-preto indicou similaridade média de 40% (dados não mostrados).

Na análise conjunta (A e P), 17 *primers* apresentaram polimorfismo, produzindo ampliações que resultaram em 94 bandas. A similaridade média foi de 38% (Figura 1). Pela análise de agrupamento hierárquico, os acessos de picão-preto foram separados em três

grupos distintos: o primeiro foi composto pelo acesso P5; o segundo, pelos acessos P6, P9, P10, P11, A3 e A4; e o terceiro, pelo acesso A1. Não houve regressão significativa ( $P > 0,05$ ) entre o coeficiente de similaridade genética dos acessos e a distância geográfica (Figura 2).

O valor médio de 38% para a similaridade genética entre os acessos de picão-preto A e P avaliados conjuntamente é baixo e equivale-se ao coeficiente de similaridade médio encontrado por Hernandes (2004) para acessos resistentes do gênero *Bidens* em uma mesma propriedade no Rio Grande do Sul (27%). Esse valor contrasta com o coeficiente de espécies cultivadas, como a soja, as quais, devido ao melhoramento, apresentam homogeneidade entre os indivíduos. Em trigo, o coeficiente de similaridade médio equivaleu a 73% (Freitas et al., 2000). Já as plantas daninhas mostram elevada variabilidade genética nas populações, uma vez que se desenvolvem e evoluem em múltiplos ambientes (Winkler et al., 2002). Entre populações de *Euphorbia heterophylla* (leiteira) suscetíveis a herbicidas,



**Figura 1** - Dendrograma de acessos de picão-preto (A e P) resistentes aos herbicidas inibidores da ALS, coletados a distâncias geográficas conhecidas. A linha pontilhada indica similaridade genética média.

a similaridade genética observada foi de 39% (Vasconcelos et al., 2000). Quando populações de leiteira resistentes aos inibidores da ALS foram avaliadas quanto à similaridade genética, esta equivaleu a 40% (Winkler et al., 2003).

Elevada variabilidade genética em uma população de plantas daninhas pode predispor esta população a uma elevada frequência inicial para o alelo de resistência, contribuindo para a rápida seleção de biótipos para a resistência aos herbicidas (Vargas et al., 1999). Constatou-se, em *Lactuca serriola*, resistência aos inibidores da ALS apenas cinco anos após o início da comercialização de chlorsulfuron (Saari et al., 1994). A frequência gênica inicial de um alelo de resistência é definida como a proporção em que aparecem em uma população os alelos alternativos do gene. A frequência inicial do alelo de resistência em *Lolium rigidum* é de  $10^{-4}$  plantas (Preston & Powles, 2002).

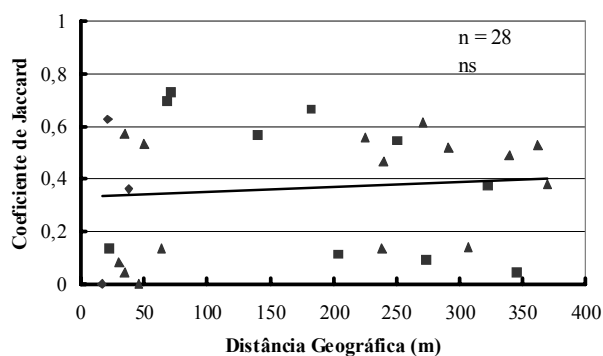
Em trabalho realizado com biótipos resistentes de picão-preto, Hernandez (2004) propõe a ausência de efeito fundador, o qual é definido como o estabelecimento de nova população a partir de poucos indivíduos que carregam consigo somente uma pequena fração da variação genética total da população parental (Ridley, 2003). Ele ocorre quando uma população passa por forte pressão de seleção, denominada de “gargalo”, no qual somente alguns indivíduos sobrevivem. No caso de acessos resistentes, haveria redução da variabilidade genética na população, em virtude da seleção que estaria ocorrendo nos indivíduos para resistência aos herbicidas. Todavia, a baixa similaridade genética entre os acessos de picão-preto resistentes encontrada por Hernandez (2004) (27%) e também no presente trabalho (38%) indica não estar ocorrendo efeito fundador. Isso sugere que a resistência ocorreu em muitos indivíduos distribuídos ao acaso na área avaliada.

Era esperada maior similaridade entre os acessos de picão-preto, uma vez que todos pertencem à mesma propriedade, são resistentes aos herbicidas inibidores da ALS e foram coletados a distâncias relativas de no máximo 400 m. Em geral, é esperada maior similaridade entre os acessos originados de mesmo

local, em relação àqueles de origens distintas (Xu et al., 2003). No entanto, devido à elevada variabilidade genética característica de plantas daninhas, à ausência da ação de efeito fundador, mesmo se tratando de acessos resistentes a herbicida, e à influência de outros fatores, como a autogamia da espécie, há favorecimento de baixa similaridade entre os acessos. O picão-preto é uma espécie autógama, o que naturalmente reduz a ocorrência de fluxo gênico.

A baixa similaridade geral entre os acessos indica que a resistência na propriedade provavelmente está surgindo por mutações espontâneas. Contudo, em razão da grande quantidade de acessos no grupo 2, também pode estar havendo disseminação de sementes, já que o fluxo gênico via pólen entre os acessos é reduzido.

Indivíduos com elevada similaridade genética formam “ilhas” (Grant, 1977), onde há maior probabilidade de ocorrer fluxo gênico via pólen ou semente. A análise da Figura 2 permite observar pares de indivíduos com coeficiente de Jaccard próximo a 80%, à distância geográfica aproximada de 170 m. Pode-se especular que esta distância corresponde ao diâmetro geográfico da ilha de indivíduos na espécie *Bidens pilosa*, nas condições da área em estudo.



**Figura 2** - Regressão entre distância geográfica e distância genética para o conjunto de acessos de picão-preto (A e P) (▲) resistentes aos herbicidas inibidores da ALS. Os grupos de acessos, quando analisados isoladamente (acesso A com A; acesso P com P), estão representados da seguinte forma: A (◆) e P(■) (n = número de pares de acessos avaliados na regressão; ns = indica regressão não significativa).



Em relação à técnica de RAPD, a repetição da análise é obtida para cada novo *primer* utilizado no cálculo da similaridade genética. O número de *primers* utilizados neste trabalho foi muito superior ao mínimo necessário para detectar a variabilidade entre as populações estudadas (Ercan et al., 2004).

Os resultados mostram que existe baixa similaridade entre acessos de picão-preto resistentes aos inibidores da ALS coletados em uma mesma propriedade, a uma distância máxima de 400 m. Não há relação entre variabilidade genética e distância geográfica para os acessos avaliados.

### AGRADECIMENTOS

Ao Eng.-Agr. Anderson Nunes, pela coleta das sementes e pelo auxílio no cultivo dos acessos em casa de vegetação. À CAPES, CNPq e FAPERGS, pelo apoio aos pesquisadores e ao projeto.

### LITERATURA CITADA

- ERCAN, A. G.; TASKIN, M.; TURGUT, K. Analysis of genetic diversity in turkish sesame (*Sesamum indicum* L.) populations using RAPD markers. **Genetics Res. Crop Evolut.**, v. 51, n.6, p.599-607, 2004.
- FREITAS, L.B. et al. Extreme homogeneity among Brazilian wheat genotypes determined by RAPD markers. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 35, n. 11, p. 2255-2260, 2000.
- GRANT, V. **Organismic evolution**. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1977. 418 p.
- 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. 109 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- HOLT, R. D.; HOCHBERG, M. E. When is biological control evolutionary stable (or is it?). **Ecology**, v. 78, n. 14, p. 1673-1683, 1997.
- INSTITUTE STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM – SAS. **User's guide: version 6. 4.ed.** Cary: 1989. 46 p.
- MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S.C.K. Milach, 1998. 141 p.
- MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 8, n. 9, p. 4321-4325, 1980.
- 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, n. 1, p. 8-13, 2002.
- RIDLEY, M. **Evolution**. Oxford: Blackwell, 2003. 768 p.
- RIZZARDI, M. A. et al. Perdas de rendimento de grãos de soja causadas por interferência de picão-preto e guanxuma. **Ci. Rural**, v. 33, n. 4, p. 621-627, 2003.
- ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Port Jefferson: Applied Biostatistics, 2000. 38 p.
- RUTLEDGE, J.; TALBERT, R. E.; SNELER, C. H. RAPD analysis of genetic variation among propanil-resistant and susceptible *Echinochloa crusgalli* populations in Arkansas. **Weed Sci.**, v. 48, n. 6, p. 669-674, 2000.
- SAARI, L. L.; COTTERMAN, J. C.; THILL, D. C. Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. In: POWLES, S. B.; HOLTUM LEWIS, J. A. M. (Eds.) **Herbicide resistance in plants biology and biochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 83-139.
- SILVERSTOWN, J. W.; LOVETT DOUST, J. **Introduction to plant population ecology**. Oxford: Blackwell Scientific, 1993. 102 p.
- VARGAS, L. et al. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Viçosa: Leandro Vargas, 1999. 131 p.
- VASCONCELOS, M. J. V. et al. Variabilidade genética em biótipos de leiteiro de Londrina/PR. **Planta Daninha**, v. 18, n. 2, p. 285-291, 2000.
- VIDAL, R. A. **Herbicidas: mecanismo de ação e resistência de plantas**. Porto Alegre, 1997. 165 p.
- XU, C. Y. et al. Genetic diversity of alligator weed in China by RAPD analysis. **Biodiver. Conser.**, v. 12, n. 4, p. 637-645, 2003.
- WINKLER, L. M.; VIDAL, R. A.; BARBOSA NETO, J. F. Aspectos genéticos envolvidos na resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **R. Plantio Direto**, v. 70, n. 4, 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. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 38, n. 9, p. 1067-1072, 2003.

