

GENES RELACIONADOS À DETOXIFICAÇÃO DE IMAZETHAPYR EM CAPIM-ARROZ (*Echinochloa crus-galli*)

Giliardi Dalazen¹; Catarine Markus¹; Christian Menegaz²; Rafael Schwalm Rafaeli²; Aldo Merotto Júnior³

Palavras-chave: metabolização, P450, GST, resistência.

INTRODUÇÃO

Algumas espécies de plantas daninhas resistentes a herbicidas ainda não apresentam os seus mecanismos de resistência totalmente elucidados, como é o caso de populações de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) resistentes a imazetapir (Heap, 2015). O capim-arroz é uma das principais plantas daninhas da cultura do arroz irrigado no sul do Brasil (Agostinetto et al., 2010). Essa planta daninha pode provocar perdas de até 90% na produtividade do arroz, dependendo da densidade da infestante, cultivar e manejo da irrigação da lavoura (Pinto et al., 2008).

Há indícios de que a resistência de *E. crus-galli* a imazethapyr em algumas populações do RS seja devida ao incremento de metabolização desses herbicidas por enzimas P450 (Matzenbacher et al., 2012). Da mesma forma, biótipos resistentes de *E. crus-galli* nos Estados Unidos demonstraram como mecanismo parcial de resistência a herbicidas inibidores da enzima ALS a metabolização por P450 (Riar et al., 2012). Na China, biótipos de *E. crus-galli*, resistentes a herbicidas inibidores da enzima ACCase, apresentaram maior atividade da enzima GST, ao serem comparados com biótipos de populações suscetíveis (Huan et al., 2011). Dessa forma, o objetivo desse trabalho é identificar e avaliar a expressão de genes que codificam enzimas detoxificadoras de herbicidas (P450 e GST), possíveis responsáveis pela resistência e de capim-arroz ao herbicida imazethapyr.

MATERIAL E MÉTODOS

As populações de capim-arroz foram selecionadas baseando-se em estudos realizados previamente. Esses estudos demonstraram que, em algumas dessas populações, a resistência a imazethapyr não está relacionada à insensibilidade da enzima, já que não foram constatadas mutações no gene que codifica a enzima acetolactato sintase (ALS) (Bortoly, 2013). Além disso, a utilização de produtos inibidores da ação de enzimas P450 (malathion) reverteu a resistência em plantas de populações resistentes (Matzenbacher et al., 2012). Baseado nisso, foi selecionada a população ARRGR01 (Arroio Grande, RS), caracterizada como resistente a imazethapyr, com ausência de mutação no gene ALS e com ocorrência de reversão da resistência ao se utilizar inibidores de enzimas de metabolização, indicando que o mecanismo de resistência poderia ser o metabolismo diferencial. Como suscetível, foi utilizada a população SUSSP01, oriunda de São Paulo (São Paulo).

Foram avaliados quatro genes CYP (P450) e três genes GST (Tabela 1). Os primers foram desenhados a partir do programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) a partir de sequências depositadas no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Para a produção das plantas, as sementes de capim-arroz foram acondicionadas em placas de Petri e mantidas em BOD (25°C) até a germinação. As plântulas foram transplantadas em vasos perfurados na base, com volume de 200 mL, contendo como substrato a mistura de solo e composto orgânico (3:1), além de fertilizante mineral. As

¹ Doutorando, PPG Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil, (giliardidalazen@gmail.com)

² Graduando em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil.

³ Professor, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil.

plantas foram mantidas em casa de vegetação climatizada, em temperatura de 25°C, até o estágio de três a quatro folhas, momento em que foi realizada a aspersão do herbicida. Os tratamentos constaram de plantas resistentes (ARRGR01) e suscetíveis (SUSSP01), tratadas e não tratadas com o herbicida. Para cada tratamento foram utilizadas três repetições biológicas. A aspersão do herbicida imazetaphyr foi realizada em câmara de pulverização automatizada, utilizando-se volume de calda 200 L ha⁻¹ e ponta de pulverização do tipo DG 110.02. A pulverização foi realizada em pressão constante de 50 lb pol⁻² e velocidade de deslocamento de 1 m s⁻¹. A dose de imazethapyr utilizada foi de 106 g de ingrediente ativo (ia) ha⁻¹, acrescido de adjuvante Dash (0,5%).

Tabela 1. Genes *CYP* e *GST* avaliados e espécies em que esses genes estão relacionados em processos de detoxificação de herbicidas.

Gene	Código <i>GenBank</i>	Espécie
<i>CYP81A6</i>	DQ341412	<i>Oryza sativa</i>
		<i>Digitaria nuda</i>
<i>CYP71C30</i>	AF321858	<i>Lolium rigidum</i>
<i>CYP71Ak2</i>	AB733990	<i>E. phyllopongon</i>
<i>CYP72A254</i>	AB755796.1	<i>E. phyllopongon</i>
<i>OsGSTL1</i>	DQ319906	<i>Oryza sativa</i>
<i>LrGSTF1</i>	HF548530	<i>Lolium rigidum</i>
<i>EcGST1</i>	JX518596	<i>Echinochloa crus-galli</i>

Amostras de aproximadamente 0,1g de folhas de plantas tratadas e não tratadas com imazetaphyr foram coletadas 24 horas após a aplicação dos herbicidas. A extração do mRNA foi realizada pelo método Trizol® (Invitrogen). A concentração de RNA extraído foi quantificada utilizando-se espectrofotômetro Genesys 2® (Thermo Spectronic), em comprimento de onda de 260 nm e diluído a 1 µg µL⁻¹. Uma alíquota de 3 µg de RNA total de cada tratamento foi tratada com DNase® I (Invitrogen). Em seguida, foi sintetizada a fita complementar (cDNA) com a enzima transcriptase reversa SuperScript® III (Invitrogen), a partir de 3 µg de RNA, utilizando iniciadores polidT. As reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foram realizadas com a programação inicial de 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C. Cada reação foi realizada com 50 ng de DNA, 10 µM de cada sequência nucleotídica iniciadora (*primers forward e reverse*), 10 µM deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), 0,2 µL de DNA polimerase, 1,5 µL de tampão (10x), e 2,5 mM de cloreto de magnésio, em um volume final de 15 µL por reação. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%, O fragmentos amplificados foram comparados com o padrão DNA ladder 100 bp.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em volume final de 20 µL, formado por 10 µL da amostra de cDNA (diluída 1:100) em água MilliQ e 10 µL dos constituintes da reação composta de 2 µL tampão 10X, 0,5 µL dNTPs (10 µM cada nucleotídeo), 1,2 µL de solução de MgCl₂ (50 mM), 2 µL de SYBR Green® (Invitrogen) diluído 1:100 (preparado no momento da utilização a partir de solução diluída 100X), 0,2 µL de ROX Reference Dye, 0,1 µL Taq Platinum® (Invitrogen) e 0,4 µL da combinação de *primers forward e reverse*. O equipamento utilizado foi o 7300 Real-Time PCR System® (Applied Biosystems) em placas contendo 96 poços PCR-96M2 – HS – C® (Axygen) com selador MicroAmp® Optical Adhesive Film (Applied Biosystems).

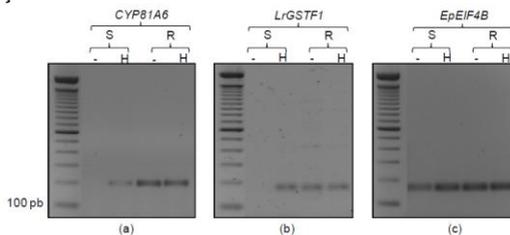
As etapas de amplificação incluíram um ciclo inicial de 95°C durante 5 minutos, seguido de uma sequência de 40 ciclos: iniciado com 94°C por 15 segundos, 60°C por 10 segundos, 72°C por 15 segundos e 60°C por 35 segundos, e um ciclo final de desnaturação de 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos, 95°C por 15 segundos e 60°C por 15 segundos.

A amplificação realizada pela reação de PCR em tempo real foi analisada pela quantificação relativa (expressão relativa), a qual determina o número de cópias de um gene

alvo em relação a um controle endógeno, no caso 28S rRNA. A análise de expressão relativa foi realizada através da fórmula de Dussault & Pouliot (2006), onde o $\Delta\Delta Ct = (Ct_{alvo} - Ct_{28S}) - (Ct_{calibrador} - Ct_{28S})$, sendo o $\Delta\Delta Ct$ a expressão relativa do gene, e a aplicação do resultado em $2^{(\Delta\Delta Ct)}$ fornece a dimensão de variação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos apontam que dois genes codificantes de enzimas detoxificadoras possam estar envolvidos no processo de resistência de capim-arroz ao herbicida imazetaphyr. Entre os genes avaliados até o momento, um gene *CYP* e outro *GST* apresentaram expressão diferencial em plantas resistentes, tanto na presença quanto na ausência de imazetaphyr. Ainda, plantas suscetíveis tratadas com o herbicida também apresentaram a expressão desses genes (Figura 1), indicando que a expressão pode ser induzida na pela presença do herbicida.



S: suscetível; R: resistente; H: com herbicida imazetaphyr.

Figura 1. Expressão dos genes *CYP81A6* (a), *LrGSTF1* (b) e *EpEIF4B* (c) em plantas suscetíveis (S) e resistentes (R) de capim-arroz em resposta à aplicação de imazetaphyr.

O gene *CYP81A6* (Figura 1a) apresentou maior expressão nas plantas resistentes. Na população resistente as bandas relativas à amplificação do gene foram mais pronunciadas, indicando a sua maior expressão. Na análise de PCR em tempo real (Figura 2), a expressão em plantas resistentes que receberam a aplicação do herbicida foi 3,6 vezes maior, quando comparada à população suscetível, sem herbicida. Nas plantas resistentes, sem herbicida, a expressão desse gene foi 1,7 vezes maior. Sendo assim, a presença do herbicida aumentou a expressão relativa do gene *CYP81A6* em 1,9 vezes. Esse gene já foi identificado como responsável pela detoxificação de herbicidas em arroz (*Oryza sativa*) (Liu et al., 2012).

Além do gene *CYP81A6*, um gene *GST* apresentou expressão diferencial em plantas resistentes. O gene *LrGSTF1* foi expresso em plantas resistentes, tanto na presença quanto na ausência de herbicida (Figura 1b). O gene *LrGSTF1* apresentou expressão relativa na ordem de 2,8 vezes nas plantas resistentes que receberam herbicida, quando comparadas às plantas suscetíveis, não tratadas (Figura 2). Além disso, plantas resistentes que não receberam a aplicação de herbicida, assim como plantas suscetíveis tratadas, apresentaram expressão relativa de aproximadamente 1,5 vezes quando comparadas às plantas suscetíveis não tratadas com o herbicida imazetaphyr. Esse gene foi identificado como responsável pela resistência múltipla de azevém (*Lolium rigidum*) a herbicidas (Cummins et al., 2013). Plantas suscetíveis que não aspergidas com o herbicida imazetaphyr não apresentaram expressão dos genes *CYP81A6* e *LrGSTF1*.

Além desses genes, foi constatada a expressão diferencial do gene *EpEIF4B* (Figura 1c), que codifica para um fator de iniciação de tradução. A expressão desse gene foi observada tanto em plantas suscetíveis quanto em resistentes, independentemente da presença ou ausência de herbicida. Esse resultado poderia ser esperado, uma vez que se trata de um gene constitutivo, essencial para o processo de síntese protéica. No entanto, observa-se que plantas suscetíveis não tratadas apresentaram menor expressão do gene. Plantas resistentes que receberam a pulverização do herbicida, a expressão foi aproximadamente

10 vezes maior, quando comparada às plantas suscetíveis, sem herbicida (Figura 2). Nas plantas resistentes que não foram tratadas, a expressão foi 8,7 vezes maior, demonstrando que esse gene foi altamente expresso nas plantas resistentes, mesmo na ausência de herbicida. Por outro lado, plantas suscetíveis que foram tratadas apresentaram alta expressão desse gene (5,63 vezes), indicando que a sua expressão foi induzida na presença de imazetaphyr, mesmo em plantas suscetíveis.

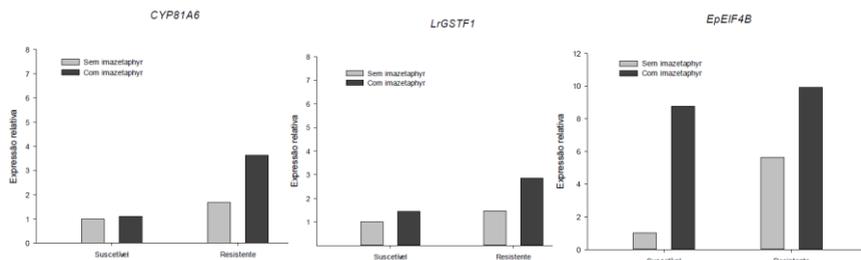


Figura 2. Expressão relativa dos genes *CYP81A6*, *LrGST1* e *EpEIF4B* em plantas suscetíveis (SUSSP01) e resistentes (ARRGR01) de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) em resposta à aplicação de imazetaphyr.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que a maior expressão do gene *EpEIF4B*, que codifica para um fator iniciador de tradução, juntamente com a maior expressão dos genes *CYP81A6* e *LrGST1*, que codificam para enzimas detoxificadoras, podem explicar a resistência a imazetaphyr de plantas de capim-arroz na população resistente usada neste estudo. Com o conhecimento do mecanismo de resistência em plantas de capim-arroz torna necessária a tomada de medidas que visem evitar a seleção e a dispersão da resistência para outras populações. Essas ações são fundamentais no combate à resistência, uma vez que mecanismos de resistência não relacionados ao local de ação do herbicida podem causar resistência múltipla a vários herbicidas, estreitando as opções de controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINETTO, D. et al. Interferência e nível de dano econômico de capim-arroz sobre o arroz em função do arranjo de plantas da cultura. **Planta daninha**, v. 28, p. 993-1003, 2010.
- CUMMINS, I. et al. Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. **PNAS**, v. 110, p. 5812-5817, 2013.
- HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. Disponível em: www.weedscience.org. Acesso em 15 de junho de 2015.
- HUAN, Z. et al. Resistance level and metabolism of barnyard-grass (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.) populations to quizalofop-p-ethyl in Heilongjiang province, China. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 10, p. 1914-1922, 2011.
- MATZENBACHER, F.O. et al. Diagnóstico do mecanismo de resistência de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) a imazetaphyr e quinclorac. In: XXVIII CBCPD, Campo Grande, MS, 2012.
- PINTO, J.J.O. et al. Controle de Capim-Arroz (*Echinochloa* spp.) em função de métodos de manejo na cultura do arroz irrigado. **Planta daninha**, v. 26, p. 767-777, 2008.
- RIAR, D.S. et al. Resistance of *Echinochloa crus-galli* Populations to Acetolactate Synthase-Inhibiting Herbicides International. **Journal of Agronomy**, v. 2012, 8 p., 2012.