

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE
CAPIM-COLCHÃO (*Digitaria nuda*) E RESPOSTA À
AMETRINA**

Viviane Cristina Vieira

Bióloga

JABOTICABAL, SP – BRASIL

2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE CAPIM-
COLCHÃO (*Digitaria nuda*) E RESPOSTA À AMETRINA**

Viviane Cristina Vieira

Orientadora: Profa Dra Janete Aparecida Desidério Sena

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL, SP – BRASIL

Julho de 2007

V665c Vieira, Viviane Cristina
Caracterização molecular de acessos de capim-colchão (*Digitaria nuda*) e resposta à ametrina / Viviane Cristina Vieira. -- Jaboticabal, 2007
viii, 58 f.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007

Orientadora: Janete Aparecida Desidério Sena

Banca examinadora: Robinson Antonio Pitelli, Josélia Oliveira Marques, Núbia Maria Correia, José Eduardo Garcia

Bibliografia

1. Gene *psbA*. 2. Planta daninha. 3. PCR-RAPD. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632:574.8

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

VIVIANE CRISTINA VIEIRA -

nascida em 09 de março de 1976, na cidade de Jaboticabal - SP, é Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais, formada pelo Centro Universitário de Araraquara - UNIARA, Araraquara - SP, em 18 de fevereiro de 2000. O título de mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) foi obtido junto à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Câmpus de Jaboticabal, em 28 de julho de 2003.

"A inexperiência é o que permite
a um jovem fazer aquilo que
um homem mais velho sabe
que é impossível"

James Thaurber

Aos meus pais Oswaldo e Antonia (in memoriam),
por serem a minha vida!

Aos meus irmãos Vera, Vânia, Wanda,
Oswaldo, Odilson, Vilmará, Valdirene
e aos sobrinhos Fabiana, Rodrigo,
Tiago, Rafael, Larissa, Andressa,
Kaique, Lucas, Caroline, Livia
e Isabela, por todo o amor,
alegria e ternura.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo privilégio de desfrutar da vida e iluminar meu caminho;

À Prof^a Dra Janete Aparecida Desidério Sena, por ter sido minha orientadora e a quem tenho respeito. Agradeço pela orientação, ensinamentos e por toda confiança em mim depositada;

Ao Prof. Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves, não só pela co-orientação, mas pela paciência, dedicação, confiança e exemplo de profissionalismo;

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, por ter me recebido em seu laboratório e por toda ajuda prestada;

Aos membros da banca examinadora: Dr. Robinson Antonio Pitelli, Dra Josélia Oliveira Marques, Dra Núbia Maria Correia e Dr. José Eduardo Garcia, pelas contribuições extremamente valiosas;

À Simone Cristina Picchi, pela amizade sincera, exemplo profissional, dedicação e por toda ajuda prestada durante a execução deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Biologia e Manejo de Plantas Daninhas, em especial, à Mariluce P. Nepomuceno, ao Tiago Furtado Bachega, José Valcir Fidelis Martins e Marco Antonio Farias, pela paciência a uma bióloga e por toda ajuda durante as análises agronômicas;

Ao Maurício Egídio Cantão e Luciano Takeshi Kishi, pela ajuda nas análises de bioinformática;

Aos amigos do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada: Ana Maria, Camila, Elaine, Eliane, Irlan, Janaína, Juliana Costa, Juliana Rossi, Juliana Xavier, Larissa, Martinha, Najara, Natália, Paula, Paulo, Sandrinha, Suzana e Vivian, pela amizade e por estarem serem prontos a me ajudar.

Aos colegas aqui não citados e também aos que já foram em busca dos seus ideais, deixando muitas saudades;

À Lucília Macedo Mandú Tremiliosi, pela amizade, palavras de incentivo e pelas longas conversas de desabafos no bar do “Quirino”;

À minha tia Ilda Rosales Fabiano, pelo apoio, torcida em todos os momentos e carinho;

Aos funcionários do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, em especial ao Aldo e a D. Lucinda, pela amizade;

À FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal e ao corpo docente do Programa de Mestrado e Doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas);

À Fundação CAPES, pela concessão da bolsa;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Interferência das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar...	4
2.2. Controle químico e mecanismo de ação dos herbicidas.....	5
2.3. Descrição do gênero <i>Digitaria</i>	9
2.4. Técnica de PCR - RFLP.....	12
2.5. Técnica de RAPD.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Coleta de acessos de capim-colchão.....	17
3.2. Eficácia agronômica da ametrina no controle de <i>Digitaria nuda</i>	17
3.3. Teores de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e total.....	18
3.4. Extração e quantificação de amostras de DNA do tecido vegetal....	19
3.5. Aplicação da técnica de PCR - RFLP para o gene <i>psbA</i>	20
3.5.1. Análise dos fragmentos de restrição.....	21
3.6. Seqüenciamento e análise das seqüências.....	22
3.7. Marcadores RAPD na análise da diversidade genética de <i>Digitaria nuda</i>	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. Eficácia agronômica da ametrina no controle de <i>Digitaria nuda</i>	26
4.2. Teor de clorofila das folhas.....	33
4.3. Análise dos fragmentos de restrição dos produtos amplificados.....	36
4.4. Análise dos fragmentos seqüenciados.....	39
4.5. Análise da similaridade genética entre os acessos por RAPD.....	43

5. CONCLUSÕES.....	48
6. REFERÊNCIAS.....	49

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores arbitrários e seus respectivos números de acesso à coleção.....	24
Tabela 2. Matriz de similaridade genética entre os acessos de <i>D. nuda</i> obtida pelo método do coeficiente de NEI (1986).....	45

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Plantas de capim-colchão (<i>D. nuda</i>) mantidas em casa de vegetação. (A) estágio de crescimento vegetativo e (B) estágio de inflorescência.....	11
Figura 2. Relação número de folhas/planta dos acessos de <i>D. nuda</i> usadas como plantas testemunhas e no tratamento antes da aplicação da ametrina. Média de pelo menos três repetições \pm erro padrão.....	27
Figura 3. Porcentagem de controle visual dos acessos de <i>D. nuda</i> , avaliados aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) e 28 (D) DAA da ametrina na dose de 2400 g i.a./ha. Média de pelo menos três repetições \pm erro padrão.....	28
Figura 4. Rebrotas dos acessos 10 (A) e 14 (B) de <i>D. nuda</i> aos 28 DAA da ametrina. Planta testemunha (T); Tratamento com ametrina a 2400 g i.a./ha (H).....	29
Figura 5. Relação número de folhas/planta dos acessos de <i>D. nuda</i> usadas como plantas testemunhas e no tratamento antes da aplicação da ametrina. Média de cinco repetições \pm erro padrão.....	30
Figura 6. Porcentagem de controle visual dos acessos de <i>D. nuda</i> , avaliados aos 7 (A) e 14 (B) DAA da ametrina na dose de 2400 g i.a./ha. Média de cinco repetições \pm erro padrão.....	31
Figura 7. Suscetibilidade dos acessos de <i>D. nuda</i> submetidos ao tratamento com ametrina (2400 g i.a./ha) avaliados aos 7 (A) e 14 (B) DAA. Tratamento com ametrina (H); Plantas testemunhas (T).....	32

- Figura 8. Teor de clorofila total (UR) das folhas dos acessos de *D. nuda* avaliados aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) e 28 (D) DAA da ametrina. Média de pelo menos três repetições \pm erro padrão..... 34
- Figura 9. Teor de clorofilas *a*, *b* e total (mg/gMF) das folhas das plantas testemunhas dos acessos de *D. nuda*. Média de três repetições \pm erro padrão..... 35
- Figura 10. Amplificação dos acessos de *D. nuda* com os iniciadores P1 e P2. MM = marcador molecular (“1kb Plus DNA Ladder”); CN = controle negativo. Os números acima das canaletas referem-se aos acessos..... 36
- Figura 11. Produto de amplificação de uma região conservada do gene *psbA* digerido com a enzima *MaeI*. MM = marcador molecular (“Mass Ruler™ DNA Ladder Low Range ready-to-use”); ND = fragmento não digerido. Os números acima das canaletas referem-se aos acessos..... 37
- Figura 12. Alinhamento da seqüência dos nucleotídeos de uma região do gene *psbA* de *D. nuda*, tendo referência as espécies *S. vulgaris* (ref. AF061287) e *O. sativa* (ref. M36191). A seta indica o acesso e a posição que sofreu a mudança de base C-T. O retângulo indica a seqüência de corte da enzima *MaeI*..... 41
- Figura 13. Alinhamento da seqüência dos aminoácidos de uma região do gene *psbA* de *D. nuda*, tendo referência as espécies *S. vulgaris* (ref. AF061287) e *O. sativa* (ref. M36191). O retângulo indica a posição em que ocorreu a troca de aminoácidos..... 42
- Figura 14. Amplificação dos acessos de *D. nuda* com o iniciador de número 249. A seta indica o polimorfismo gerado para o acesso 2. MM = marcador

molecular (“1kb DNA Ladder”); CN = controle negativo. Os números acima das canaletas referem-se aos acessos..... 44

Figura 15. Amplificação dos acessos de *D. nuda* com o iniciador de número 290. MM = marcador molecular (“1kb DNA Ladder”); CN = controle negativo. Os números acima das canaletas referem-se aos acessos..... 44

Figura 16. Filograma de similaridade genética entre os acessos de *D. nuda*, obtido pela matriz de similaridade genética. Os números referem-se aos acessos..... 46

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE CAPIM-COLCHÃO (*Digitaria nuda*) E RESPOSTA À AMETRINA

RESUMO - As plantas daninhas da família Poaceae são as principais plantas que infestam a cultura de cana-de-açúcar. As espécies de gramíneas conhecidas por capim-colchão, estão entre as de maior ocorrência nas lavouras de cana-de-açúcar no Brasil. Atualmente o uso do controle químico está sendo o mais empregado para controle de *Digitaria*, porém há alguns relatos de falha no controle, principalmente com referência a herbicidas pertencentes ao grupo das triazinas, que bloqueiam a cadeia fotossintética, no fotossistema II. As técnicas moleculares estão sendo bem recomendadas para análise da diversidade genética em plantas daninhas. Para a caracterização molecular vinte iniciadores foram utilizados para o RAPD e, para o PCR-RFLP utilizou-se de dois iniciadores específicos P1 e P2 e a enzima de restrição *MaeI*. O seqüenciamento foi realizado com o amplicom produzido com os iniciadores P1 e P2. Para o tratamento químico utilizou-se a ametrina. Com isso, esse trabalho teve como objetivos: caracterizar dez acessos de *Digitaria* spp. por marcadores RAPD e PCR-RFLP, sequenciar uma região conservada do gene *psbA* e verificar possíveis associações entre o polimorfismo desse gene e a resposta fenotípica à ametrina. Pela análise molecular não houve variabilidade genética entre os acessos e todos apresentaram a mesma resposta fenotípica ao herbicida utilizado. Com esses resultados, concluiu-se que o capim-colchão dos dez acessos estudados pertence à espécie *Digitaria nuda* e não foi observada relação entre a ocorrência de polimorfismo e a suscetibilidade à ametrina, provavelmente porque todos os acessos estudados foram controlados na dose recomendada do herbicida.

Palavras-chave: gene *psbA*, planta daninha, RAPD, seqüenciamento, triazina

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ACCESSIONS OF CRABGRASS
(*Digitaria nuda*) AND RESPONSE TO AMETRYN**

SUMMARY - The weed of family Poaceae are the most important infesting sugarcane crop plants. The gramineous species known as crabgrass are among the ones with high occurrence in Brazil sugarcane crop. Presently the use of chemical control is being the most common way used for the control of *Digitaria*, but with few controlling occurrences fails, with emphasis for those herbicides belonging to triazine group which block the photosynthetic chain at the photosystem II level. Molecular techniques are being recommended for the analysis of the genetic diversity such weed. For the molecular characterization twenty primers were used for RAPD and for the PCR-RFLP a set of two specific primers P1 and P2 were used together with restriction enzyme *MaeI*. The DNA sequencing was performed with an amplicon sample produced with the primers P1 and P2. For the chemical treatment control ametryn was selected. Thus this work had objectives as follows: to characterize ten accessions of *Digitaria* spp. by RAPD and PCR-RFLP markers, and to sequence a conserved region of the *psbA* gene so as to investigate the possible polymorphic associations of this gene in response to the phenotypic response to ametryn. For the molecular analysis it did not have genetic variability among the accessions and all had presented the same phenotypic response to the used herbicide. Based on the obtained results, it is concluded the crabgrass that ten collected accessions belong to the species *Digitaria nuda*, and it was not observed any relation among the polymorphism and susceptibility to ametryn probably because all the studied accessions had been controlled in the recommended dose of the herbicide.

Key words: *psbA* gene, RAPD, sequencing, triazine, weed

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, destacando-se os Estados de São Paulo, Paraná, Alagoas, Minas Gerais, Pernambuco e Rio de Janeiro como os principais produtores (SEVERO, 2003). A produção brasileira de cana-de-açúcar na safra de 2005/2006 atingiu algo em torno de 423 milhões de toneladas (AGRIANUAL, 2006).

Dentre os fatores responsáveis pela limitação da produtividade da cana-de-açúcar, a interferência imposta pelas plantas daninhas é considerada como um dos mais importantes. As plantas daninhas chegam a reduzir a produtividade desta cultura em mais de 80% (SILVA, 2006), dependendo dos fatores inerentes à cultura, às plantas daninhas, ao meio e ainda, ao período de convivência cultura-plantas daninhas (PITELLI, 1985).

As plantas da família Poaceae (gramíneas) são as principais plantas infestantes da cultura de cana-de-açúcar, tanto nas áreas de plantio, como nas áreas de soqueiras. O gênero *Digitaria* inclui cerca de 300 espécies que ocorrem em regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios (CANTO-DOROW, 2001a) e estão entre as de maior frequência nas lavouras de cana-de-açúcar no Brasil. No Estado de São Paulo, este gênero apresenta 13 espécies descritas e a diferenciação visual dessas espécies torna-se difícil de ser feita no campo devido à grande semelhança morfológica entre elas (DIAS et al., 2003). A diferenciação é realizada basicamente pelas características morfológicas da espiguetas (DIAS et al., 2005a).

O manejo de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar tem sido realizado pelo uso combinado do controle químico (aplicação de herbicidas) com o controle mecânico (cultivador). Atualmente, o emprego de herbicidas constitui-se numa prática indispensável e usual nos canaviais, em virtude das extensas áreas de plantio e do elevado custo da mão-de-obra. A eventual falha no controle pode comprometer a produção da cana-de-açúcar, além de proporcionar aumento nos custos de produção (VIDAL et al., 2006).

Dentre os herbicidas registrados para a cultura da cana-de-açúcar no Brasil, destacam-se os pertencentes ao grupo químico das triazinas, principalmente a ametrina, pela eficiência no controle, quantidade de produtos comercializados e pelo tempo que esses estão sendo utilizados no Brasil.

As triazinas são herbicidas que bloqueiam a cadeia fotossintética do transporte de elétrons, no fotossistema II (FSII), por se ligarem à proteína D1 e competirem com a plastoquinona Q_B pelo sítio de ligação. O mecanismo de resistência às triazinas é a perda da ligação da molécula do herbicida ao sítio específico da proteína D1 (HOLT et al., 1993). A base molecular da resistência é uma simples mudança no par de bases na região conservada do gene cloroplastídico *psbA*, que codifica a proteína D1, resultando na substituição do aminoácido serina na posição 264 pela glicina, reduzindo a afinidade do herbicida pelo sítio de ligação na proteína (TREBST, 1987; SINNING et al., 1989).

A resistência não é herdada pelo genoma nuclear, mas pela herança maternal do DNA citoplasmático existente dentro do cloroplasto (MACHADO, 1982). Consequentemente, a resistência às triazinas não é transmitida via pólen. Dessa forma, toda progênie de uma planta resistente será também resistente (CHRISTOFFOLETI et al., 1994).

O surgimento de plantas daninhas resistentes deve-se, entre outros fatores, à prolongada utilização de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação. Deste modo, biótipos sofrem elevada pressão de seleção com esses herbicidas (WINKLER et al., 2002).

Um dos objetivos a ser alcançado no manejo integrado de plantas daninhas é a prevenção da seleção de biótipos resistentes a herbicidas. Portanto, é de vital importância que a presença de biótipos resistentes a esse herbicida seja detectada o mais cedo possível, de maneira que as estratégias de manejo possam ser estabelecidas.

Nesse sentido, a biologia molecular vem-se tornando uma importante ferramenta nos estudos com plantas daninhas. Pesquisas sobre a variabilidade genética com o uso de marcadores moleculares, como RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) e PCR-RFLP (Reação da polimerase em cadeia - Polimorfismo no comprimento de

fragmentos de restrição), por exemplo, permitem estimar a variabilidade genética dentro e entre espécies, além de servirem como ponto de partida para estudos de manejo dessas plantas, pois, aliadas ao seqüenciamento permitem localizar genes de resistência, bem como possíveis mutações relacionadas ao surgimento de indivíduos resistentes em determinadas espécies.

A detecção dessas alterações moleculares tem importância fundamental para viabilizar técnicas de controle, como o químico, uma vez que poderá haver respostas diferenciadas de possíveis materiais à ação de herbicidas, incrementando ou reduzindo a eficiência de controle.

Assim, o presente trabalho teve como objetivos caracterizar acessos de capim-colchão (*Digitaria* spp.) por marcadores RAPD e PCR-RFLP, sequenciar uma região conservada do gene *psbA* e verificar possíveis associações entre o polimorfismo desse gene e a resposta fenotípica ao herbicida ametrina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Interferência das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar

O termo interferência refere-se ao somatório de pressões que sofre uma determinada cultura decorrente da presença de plantas daninhas no ambiente comum. Essa interferência pode ser direta, por meio da competição pelos recursos essenciais ao crescimento (luz, água, nutrientes etc.), da alelopatia, do parasitismo, da interferência na colheita e nos tratos culturais e, indireta, quando as plantas daninhas atuam como hospedeiras intermediárias de pragas, doenças e nematóides (PITELLI, 1987). Segundo VIDAL et al. (2005a), plantas daninhas são vegetais superiores que ocorrem espontaneamente nas áreas de interesse agrônomo e prejudicam o crescimento e o desenvolvimento das plantas cultivadas.

Uma cultura, ao ser implantada em determinado agroecossistema, encontra no solo certa quantidade de diásporos que vão emergir espontaneamente durante o ciclo da vida da planta cultivada. Neste período, estabelece-se uma relação de interferências envolvendo a cultura e a comunidade infestante e é do balanço final desta relação que se tem a produtividade da planta cultivada e a quantidade de propágulos produzidos pelas plantas daninhas (PITELLI, 1985).

Os fatores que afetam o grau de interferência entre as plantas daninhas e as plantas cultivadas foram descritos em um esquema proposto por BLEASDALE (1960), posteriormente adaptado por BLANCO (1972) e PITELLI (1985). Segundo este esquema, o grau de interferência depende de fatores ligados à própria cultura (espécie, espaçamento e densidade de plantio), à comunidade infestante (composição específica, densidade e distribuição) e às condições específicas em que ocorre a associação entre a cultura e a comunidade infestante, principalmente às condições edáficas, climáticas e de tratos culturais. Além disso, depende também da época e da extensão do período em que ocorre a convivência entre as plantas daninhas e a cultura (PITELLI, 1985).

As plantas daninhas são consideradas importantes fatores que sistematicamente afetam de maneira significativa a economia agrícola (CHRISTOFFOLETI, 1988). Essas plantas são um dos principais fatores bióticos presentes no agroecossistema da cana-de-açúcar que têm a capacidade de interferir no desenvolvimento e na produtividade da cultura (KUVA et al., 2003). Algumas espécies de plantas daninhas podem prejudicar o rendimento do processo produtivo, alterando a eficiência das operações realizadas na cultura e a industrialização do produto colhido. As práticas de cultivo e colheita podem ser dificultadas pela presença de plantas de grande porte ou plantas trepadeiras (MATTOS, 2000).

Em virtude das conseqüências da interferência imposta pelas plantas daninhas, seja ela direta ou indireta, o controle destas é inquestionável. Portanto, reduzir ou eliminar essa interferência consiste num trato cultural de fundamental importância. Para tanto, existem vários métodos de controle de plantas daninhas, como: preventivo, cultural, mecânico, físico e químico.

2.2. Controle químico e mecanismo de ação dos herbicidas

O controle químico pelo uso de herbicidas é uma técnica mais avançada, que exige do agricultor melhores conhecimentos técnicos e uma organização racional para o trabalho. Além disso, com o crescente custo e escassez da mão-de-obra, esse método de controle passou a ter maior aceitação por parte dos agricultores. No Estado de São Paulo, a classe de herbicidas é a que tem respondido pelo maior valor das vendas de defensivos agrícolas. Em 2006, foi responsável por 43,1% do faturamento total paulista, ou seja, US\$ 348,1 milhões. Do total de 104.233 toneladas de defensivos agrícolas vendidas para a agricultura paulista em 2006, em quantidade de produto comercial, os herbicidas representaram 46,4% ou 48.370 toneladas. As vendas de herbicidas estão voltadas, principalmente, para cana-de-açúcar, soja e milho (IEA, 2007). Para a cultura da cana-de-açúcar estão registrados 35 herbicidas, envolvendo produtos puros e misturas formuladas com outros herbicidas (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005).

Os herbicidas atualmente em uso e que apresentam mecanismo de ação de inibição da fotossíntese são pertencentes aos grupos C1 (triazinas e triazinonas), grupo C2 (uréias substituídas e amidas) e grupo C3 (benzotriazolones). O local de ação destes herbicidas é na membrana do cloroplasto, onde ocorre a fase luminosa da fotossíntese, mais especificamente no transporte de elétrons (CHRISTOFFOLETI, 1997).

O mecanismo de resistência às triazinas se dá pela perda da ligação da molécula do herbicida ao sítio específico da proteína D1 (HOLT et al., 1993), codificada pelo gene cloroplastídico *psbA*. A mudança de um único par de bases na região conservada do gene, resultando na substituição do aminoácido serina (AGT) pela glicina (GGT), reduz a eficiência fotossintética e pode causar uma redução significativa em relação à taxa de crescimento e habilidade competitiva (GRONWALD, 1994).

Entre os herbicidas do grupo químico das triazinas tem-se a ametrina (2 etilamino-4-isopropilamino-6-metiltio-s-triazina) seletiva para a cultura da cana-de-açúcar, podendo ser absorvida tanto pelo sistema radicular como pelas folhas, o que condiciona sua aplicação desde a pré-emergência até a pós-emergência das plantas daninhas. Ela é indicada para o controle de plantas daninhas monocotiledôneas e dicotiledôneas, em dosagens que variam de 1,2 a 4,0 kg i.a./ha, dependendo da textura do solo e/ou do estágio de desenvolvimento das plantas. Quando absorvida pelas raízes, a ametrina é facilmente translocada pelo xilema, com movimento acrópeto, acumulando-se nos meristemas. A movimentação pelo floema é reduzida. Quando aplicada nas folhas, a translocação da ametrina é mínima, atuando como um herbicida de contato, causando destruição dos tecidos de transporte. Nas plantas suscetíveis, os sintomas começam por clorose intervenal nas folhas, evoluindo para clorose completa e necrose. Os tecidos velhos mostram mais injúria que os novos. As raízes não são afetadas (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005).

Uma planta é suscetível aos herbicidas inibidores do fotossistema II se o herbicida se acoplar ao composto Q_B componente do sistema fotossintético e, assim, impossibilitar a ocorrência do transporte do elétron até a plastoquinona. Dessa forma

não existe a produção de ATP, pois o transporte de elétrons é interrompido, bem como a produção de NADPH₂ (CARVALHO, 2004).

Porém, numa planta daninha resistente há um processo de mutação no composto Q_B de tal maneira que o herbicida não consegue acoplar-se ao composto, impedindo o transporte de elétrons. Assim, a resistência é conferida por uma mudança no local de ação do herbicida (CHRISTOFFOLETI, 1997).

Como mencionado anteriormente, a ametrina, é um herbicida que atua no fotossistema II. O FSII contém o centro de reação P680 e consiste de vários polipeptídios, incluindo um complexo central de seis polipeptídios integrais, ligados não covalentemente e codificados pelo DNA do cloroplasto. Dois destes, com massas moleculares de 33 e 31 kDa, são chamados de D1 e D2, respectivamente, ligam-se diretamente ao P680 e a certas quinonas necessárias para a oxidação da água. Também associados ao complexo central do FSII e à interface lúmen-membrana estão três polipeptídios periféricos codificados pelo genoma nuclear. O centro de reação P680 recebe energia luminosa por ressonância indutiva de um total de 250 moléculas de clorofila *a* e *b* e de numerosas xantofilas, presentes no complexo coletor de luz (CLII) (MARENCO & LOPES, 2005).

A aplicação desse herbicida nas plantas resulta no bloqueio do transporte de elétrons no FSII e, portanto, também indiretamente bloqueia a transferência de energia de excitação das moléculas de clorofila para o centro de reação do FSII. As moléculas de clorofila excitadas (clorofila singlete) formam clorofila triplete. Essa clorofila reage com oxigênio molecular formando o oxigênio singlete. A presença da clorofila triplete e do oxigênio singlete inicia a peroxidação dos lipídeos e, conseqüentemente, causando danos às membranas, que podem ser quantificados por medidas de liberação de eletrólitos (KUNERT & DODGE, 1989). Os cloroplastos se desintegram quando as plantas tratadas com triazinas são expostas à luz, enquanto nas plantas mantidas no escuro não há efeito sobre os cloroplastos (BARTELS, 1985).

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é a capacidade inerente e herdável de alguns biótipos, dentro de uma determinada população, de sobreviver e se reproduzir após a exposição à dose de um herbicida, que normalmente seria letal a uma

população normal (suscetível) da mesma espécie (KISSMANN, 1996). Já a tolerância é diferenciada da resistência, pois é uma característica inata da espécie em sobreviver a aplicações de herbicida na dose recomendada, que seria letal a outras espécies, sem alterações marcantes em seu crescimento e desenvolvimento. Assim como a tolerância, a suscetibilidade, também, é uma característica inata de uma espécie. Porém nesse caso, há alterações com efeitos marcantes no crescimento e desenvolvimento da planta, como resultado de sua incapacidade de suportar a ação do herbicida (CHRISTOFFOLETI et al., 2000).

Desde o primeiro relato feito por RYAN (1970), que observou biótipos resistentes de *Senecio vulgaris* às triazinas, tem se observado um número crescente de espécies de plantas daninhas com biótipos resistentes não somente às triazinas, mas também a outras classes de herbicidas. Atualmente, biótipos resistentes ao inibidor do FSII têm sido listados em 65 espécies de daninhas (HEAP, 2003).

Para o capim-colchão, há relatos de tolerância ao diuron em diversos campos de produção da cana-de-açúcar, onde os herbicidas dos grupos químicos das triazinas e uréias substituídas vinham sendo utilizados de forma repetitiva há vários anos (DIAS et al., 2003). DIAS et al. (2005b) verificaram que, ao estudar populações de *Digitaria* spp. submetidas a diferentes tratamentos, encontraram índices de tolerância ao GR₅₀. O índice GR₅₀ representa a dose do herbicida necessária para reduzir 50% do crescimento de uma população de planta, normalmente calculado a partir do acúmulo de biomassa ou da porcentagem de controle (DIAS et al., 2003). Desta forma, o controle químico desta planta daninha está se tornando cada vez mais problemático, dependendo, sobretudo da espécie de *Digitaria*, que pode apresentar tolerância às triazinas.

O surgimento de biótipos de plantas daninhas resistentes a certos herbicidas tem ocorrido em áreas onde é prática comum o uso repetido e subsequente dos mesmos herbicidas ou diferentes herbicidas, mas com o mesmo mecanismo de ação. Esse tipo de situação ocorre geralmente em sistemas intensivos de monocultivo, onde os herbicidas são aplicados com o objetivo de eliminar quase toda a comunidade de plantas daninhas incidentes (CHRISTOFFOLETI et al., 1994).

2.3. Descrição do gênero *Digitaria*

O gênero *Digitaria* pertence à família Poaceae (anteriormente Gramineae), subfamília Panicoideae, tribo Paniceae. No Brasil ocorre um complexo de plantas do gênero *Digitaria*, com diferenciação visual a campo bastante difícil, por isso, o nome vulgar capim-colchão é aplicado indistintamente (KISSMANN, 1997).

Este gênero foi caracterizado como plantas anuais ou perenes, rizomatosas ou não, cespitosas eretas, ou cespitoso-estoloníferas, decumbentes ou estoloníferas. Colmos floríferos eretos ou geniculados na base. Inovações intra ou extravaginais. Prefoliação convoluta. Bainhas foliares menores ou maiores do que os entrenós, glabras ou com indumento, tornando-se ou não fibrosas na maturidade; lâminas lineares, lanceoladas até oval-lanceoladas, agudas, glabras ou com indumento, planas, involutas ou convolutas, atenuadas ou arredondadas na base; lígula membranosa ou membranoso-ciliada, truncada, arredondada ou triangular, inteira a laciniada (CANTO-DOROW, 2001b).

O Brasil é o país das Américas com maior número de espécies de *Digitaria*. A riqueza específica nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste é mais ou menos equivalente, havendo um decréscimo expressivo na região Norte. Nessas regiões, as espécies habitam formações geralmente abertas como campos naturais, cerrados, sendo comum em locais alterados. Algumas espécies têm sido utilizadas como forragem, outras se destacam por serem plantas daninhas de culturas (CANTO-DOROW & LONGHI-WAGNER, 2001).

Quatorze espécies deste gênero foram encontradas no Estado de São Paulo: *D. corynotricha*, *D. neesiana*, *D. insularis*, *D. eriantha*, *D. fuscescens*, *D. connivens*, *D. sejuncta*, *D. filiformis*, *D. violascens*, *D. horizontalis*, *D. bicornis*, *D. sanguinalis*, *D. ciliaris* (CANTO-DOROW, 2001a) e *D. nuda* (DIAS et al., 2003). Dentre essas espécies, *D. horizontalis*, *D. ciliaris* e *D. nuda* são encontradas como planta infestante da cultura de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo (LORENZI, 2000; DIAS et al., 2003). Já *D. sanguinalis* é mais freqüente apenas na região Sul do país (DIAS, 2004).

A espécie *D. nuda* (Figura 1) foi descrita como planta anual, decumbente, com altura entre 14 - 70 cm. Colmos floríferos geniculados na base, glabros; nós glabros ou pilosos. Bainhas de 2 - 4 cm de comprimento, glabras ou hirsutas, tricomas tuberculados, esparsos ou densos, em toda a sua extensão ou somente nas margens. Lâminas de 1,5 - 8 cm de comprimento, 2 - 5 mm de largura, lanceoladas a oval-lanceoladas, planas, face abaxial glabra ou pilosa, tricomas tuberculados, densos ou esparsos, em toda a sua extensão, face adaxial pilosa, tricomas tuberculados densos ou esparsos, em toda a sua extensão ou na região ligular, escabras nas margens e sobre as nervuras, nas faces abaxial e adaxial. Lígula de 0,6 - 2 mm de comprimento, membranosa, arredondada, erosa. Panícula 1,4 - 5,5 cm de comprimento, ramos unilaterais em número de 2 - 6, de 2 - 4,5 cm de comprimento, ráquis alada, 0,6 mm de largura, glabra ou pilosa, tricomas tuberculados de 2 - 5 mm de comprimento, esparsos em toda a sua extensão, margens escabras. Espiguetas em número de dois por nó, 2 - 2,4 mm de comprimento, 0,6 - 0,7 mm de largura, lanceoladas; gluma inferior ausente; gluma superior 0,9 - 1,2 mm de comprimento, 0,3 - 0,5 mm de largura, até $\frac{1}{2}$ do comprimento do lema inferior, aguda, pilosa, tricomas agudos, esbranquiçados, esparsos, nas margens e entre as nervuras, ultrapassando o ápice da gluma; lema inferior 2 - 2,1 mm de comprimento, 0,6 - 0,7 mm de largura, agudo, piloso nas margens e entre as nervuras laterais, tricomas agudos, densos, ultrapassando o ápice do lema em 0,2 - 0,4 mm; pálea inferior ausente; antécio superior 1,8 - 2,2 mm de comprimento, 0,4 - 0,6 mm de largura, com flor bissexuada, lanceolado, agudo, com papilas em fileiras longitudinais, castanho claro na maturidade. Anteras 0,3 - 0,4 mm de comprimento. Cariopse 1,2 mm de comprimento, 0,4 - 0,6 mm de largura, lanceolada, zona do embrião $\frac{1}{2}$ do comprimento da cariopse (CANTO-DOROW, 2001b).

Quanto ao hábitat, cresce em ambientes variados, sendo muito comum em locais perturbados, especialmente à beira de rodovias, terrenos baldios, lavouras abandonadas e calçamentos. Vegeta em solos arenosos, secos ou úmidos. Floresce o ano inteiro, com predomínio de fevereiro a abril (CANTO-DOROW, 2001b).



Figura 1. Plantas de capim-colchão (*D. nuda*) mantidas em casa de vegetação. (A) estágio de crescimento vegetativo e (B) estágio de inflorescência.

2.4. Técnica de PCR – RFLP

A técnica de PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (“primers”) que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Estes iniciadores são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares a seqüências específicas que flanqueiam a região alvo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

O polimorfismo observado na técnica de RFLP ocorre porque o DNA de indivíduos geneticamente distintos difere na seqüência de nucleotídeos ao longo da fita. A presença ou ausência de seqüências específicas de 4 a 8 pares de bases, reconhecidas e clivadas pelas enzimas de restrição, pode variar entre diferentes indivíduos, gerando polimorfismo. Diferenças na seqüência de DNA dos indivíduos pode também resultar de inserções, deleções ou outros rearranjos (translocações, inversões) que alterem a distância entre pares de sítios de restrição. Ao ser submetido à clivagem com uma enzima de restrição, o DNA de indivíduos geneticamente distintos é cortado nos sítios de restrição, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. A base genética do polimorfismo observado resulta assim de mutações nos sítios de restrição ou de inserções, deleções e rearranjos entre estes sítios (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A técnica de RFLP é uma ferramenta molecular simples e eficiente que pode ser empregada para se detectar variabilidade genética em regiões conservadas não específicas, como também em regiões específicas entre indivíduos de uma mesma espécie, entre espécies diferentes ou mesmo entre populações (PICCHI, 2002).

A técnica de PCR-RFLP é uma junção das duas técnicas descritas e também foi empregada por CHEUNG et al. (1993) para o estudo de diversas espécies de plantas daninhas, incluindo *Brassica napus*, *Chenopodium* spp. e *Amaranthus* spp., no qual obtiveram muito sucesso.

Em 1999, FREY et al. utilizaram a técnica de PCR-RFLP para verificar a resistência à triazina em *S. vulgaris*, tendo como fragmento de estudo o produto de amplificação de uma região conservada do gene *psbA*.

Estudos feitos por STANKIEWICZ et al. (2001) com biótipos resistentes e suscetíveis à triazina em *Solanum nigrum*, também fizeram uso da análise de restrição a partir do fragmento amplificado do gene *psbA*. Essa análise permitiu separar os indivíduos suscetíveis e resistentes, tendo como base os padrões de restrição.

FRAGA & TASENDE (2003) estudaram o mecanismo de resistência ao simazine em *Sonchus oleraceus*, pela técnica de PCR-RFLP e utilizaram a enzima de restrição *MaeI* para digerir os fragmentos. Os padrões de restrição obtidos foram correlacionados com os fenótipos suscetíveis e resistentes das plantas em estudo.

A técnica de PCR-RFLP também foi utilizada por SIBONY & RUBIN (2003) para detectar resistência em *Amaranthus blitoides* à atrazine, utilizando-se do produto de PCR do gene *psbA*. Os resultados obtidos por esse marcador, confirmaram a resistência observada nos biótipos para atrazine.

Essa técnica tem sido muito bem empregada em estudo com plantas daninhas, pois pode ser utilizada como um diagnóstico molecular na busca de um indivíduo resistente dentro de uma população estudada.

2.5. Técnica de RAPD

A técnica de RAPD trata-se, segundo FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1998), basicamente de uma variação da técnica de PCR, com duas características distintas, sendo: a utilização de um oligonucleotídeo iniciador único ao invés de um par de oligonucleotídeos e o oligonucleotídeo único tem seqüência arbitrária, portanto sua seqüência alvo é desconhecida. É utilizada para caracterização genética de espécies quando se desconhecem maiores informações genéticas.

Para que haja amplificação de um fragmento RAPD no genoma analisado, duas seqüências de DNA complementares ao oligonucleotídeo arbitrário devem estar

suficientemente adjacentes (< 4000 pares de bases) e em orientação oposta, de maneira a permitir a amplificação exponencial de um segmento de DNA pela DNA polimerase. Em função da grande quantidade de DNA produzido, este segmento pode ser visualizado diretamente na forma de uma banda num gel de eletroforese (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A natureza molecular do polimorfismo RAPD não é inteiramente conhecida. Entretanto, evidências experimentais indicam que diferenças de apenas um par de bases (mutações de ponto) são suficientes para causar a não complementaridade do oligonucleotídeo com o sítio de iniciação (“priming site”) e assim impedir a amplificação de um segmento (WILLIAMS et al., 1990). Outras fontes de polimorfismo podem incluir deleções de sítios de iniciação ou inserções que colocam dois sítios de iniciação adjacentes a uma distância acima daquela que a DNA polimerase é capaz de percorrer. Assim, o polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o segmento amplificado (banda no gel) está presente ou ausente (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores RAPD apresentam algumas vantagens em relação a outros métodos de análise do DNA. Por estar fundamentada na amplificação de DNA, essa técnica pode ser simples e rápida. Um conjunto único de oligonucleotídeos arbitrários pode ser utilizado para qualquer organismo. Por não utilizar sondas, é eliminada a necessidade de radioisótopos ou marcação não radioativa. Outra grande vantagem é a quantidade mínima de DNA necessária para análise genotípica de um indivíduo. Esses marcadores também, permitem gerar uma grande quantidade de polimorfismo de segmentos de DNA, distribuídos por todo o genoma do organismo. Por se basear em PCR, a técnica de RAPD é muito mais sensível na detecção de polimorfismo ao nível de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A técnica de RAPD tem sido bem difundida para análise da variabilidade genética envolvendo plantas. Foram observados alguns trabalhos desenvolvidos com outras plantas daninhas, como o de VIEIRA (2003), que analisou a variabilidade genética em acessos de trapoeraba (*Commelina benghalensis*) em comparação à resposta fenotípica ao herbicida glifosato. Pela análise de dados do marcador RAPD,

houve uma considerável variabilidade genética entre os acessos estudados e este não permitiu agrupar, distintamente, os acessos tolerantes e sensíveis ao glifosato.

Essa técnica foi utilizada também por MARTINS et al. (2003) na análise da variabilidade genética de acessos de egéria (*Egeria* spp.), coletados em sete reservatórios de geração de energia do Estado de São Paulo. Este marcador demonstrou a existência de variabilidade genética entre as populações.

CARDOSO et al. (2003) avaliaram a sensibilidade a herbicidas de acessos de aguapé coletados no Estado de São Paulo. A escolha das plantas geneticamente diferentes foi feita com base em estudos de variabilidade genética, nos quais se utilizou a técnica de RAPD.

WINKLER et al. (2003) utilizaram da análise por RAPD na determinação da diversidade genética de populações de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes a herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase. Pela técnica detectou-se o coeficiente médio de similaridade de 40%, constatando-se então variabilidade genética entre as populações.

Em 2005, CARDOSO et al. realizaram um estudo com marcadores RAPD para caracterizar geneticamente populações de alface-d'água (*Pistia stratiotes*), coletadas em 15 reservatórios de hidrelétricas do Estado de São Paulo. Esse marcador revelou que a grande maioria dos reservatórios estudados (93%) apresentou índice de distância genética inferior a 0,30 entre as populações, formando um grupo definido.

VIDAL et al. (2005b) avaliaram por RAPD, o grau de similaridade genética entre acessos de picão-preto resistentes aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), bem como a relação entre coeficiente de similaridade genética e distância geográfica desses acessos. Por meio do marcador molecular RAPD, obteve-se uma baixa similaridade genética entre os acessos.

A técnica de RAPD foi eficiente para LAMEGO et al. (2006) que avaliaram o grau de similaridade genética entre acessos de picão-preto suscetíveis e resistentes aos herbicidas inibidores da ALS. A similaridade genética média obtida foi equivalente a 37%. Essa baixa similaridade entre os acessos evidenciou que a resistência aos

herbicidas na região estudada se configurou pela seleção de indivíduos resistentes preexistentes na população.

VIDAL et al. (2006) utilizaram o marcador RAPD para avaliar a variabilidade genética de acessos de *Bidens* spp., oriundos de uma única propriedade, para verificar a dispersão da resistência na gleba amostrada e determinar a relação entre o coeficiente de similaridade genética e a distância geográfica entre os acessos da mesma população. Como resultado, os acessos de *Bidens* spp. apresentaram grande variabilidade genética dentro da população.

As técnicas moleculares descritas permitem estimar a variabilidade genética dentro e entre espécies, além de servirem como ponto de partida para estudos de manejo dessas plantas, pois, aliadas ao seqüenciamento permitem localizar genes de resistência, bem como possíveis mutações relacionadas ao surgimento de indivíduos resistentes em determinadas espécies.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta de acessos de capim-colchão

Sementes de capim-colchão (*Digitaria* spp.) foram coletadas em dez diferentes pontos amostrais distanciados entre si, em média, por 2 km e sendo designados por acessos. As coletas foram feitas em áreas de produção comercial de cana-de-açúcar localizadas na região de São Joaquim da Barra, no Estado de São Paulo, com histórico de problemas relacionados ao controle químico.

Os propágulos foram semeados em vasos plásticos com capacidade para 1,5 L contendo uma mistura de terra (Latosolo Vermelho Escuro), areia e substrato hortícola (Plantimax HT, Eucatex), na proporção de volume de 3:1:1. Esses vasos foram mantidos em casa-de-vegetação, em área anexa ao Laboratório de Biologia e Manejo de Plantas Daninhas, do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP, para o desenvolvimento e propagação do material, coleta do material vegetal para análise molecular, identificação e herborização.

A identificação das plantas de *Digitaria* coletadas foi efetuada seguindo a chave analítica de identificação proposta por CANTO-DOROW (2006).

3.2. Eficácia agrônômica da ametrina no controle de *Digitaria nuda*

Para avaliar a suscetibilidade dos acessos de capim-colchão ao herbicida ametrina, foram instalados dois ensaios, sendo o segundo uma replicação, sob as mesmas condições, em área anexa ao Laboratório de Biologia e Manejo de Plantas Daninhas, do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP. Os propágulos de cada acesso foram semeados em copos plásticos com capacidade para 500 ml, contendo uma mistura de terra (Latosolo Vermelho Escuro), areia e substrato hortícola (Plantimax HT, Eucatex), na proporção de volume de 3:1:1. Os copos foram

mantidos sob condições de casa-de-vegetação, com irrigações periódicas. Decorridos 30 dias após semeadura, quando as plantas tinham em média quatro folhas expandidas, foi feito o desbaste, deixando-se quatro plantas por copo, com dez repetições por acesso, sendo cinco repetições usadas como testemunhas para cada acesso sem aplicação do herbicida. Dois dias após o desbaste foi feita a aplicação da ametrina na dose de 2400 g i.a./ha. A aplicação foi feita com pulverizador costal pressurizado com CO₂, munido de quatro bicos tipo leque, com pontas de 80.02 VS, com volume de calda equivalente a 200 L/ha e pressão de trabalho de 200 kPa. No primeiro ensaio, por ocasião da aplicação, a temperatura do ar foi de 23,1°C, com umidade relativa do ar de 73%, ausência de vento e nebulosidade de 5%. No segundo a temperatura do ar foi de 33,6°C, com umidade relativa do ar de 39%, vento de 2,5 Km/h e nebulosidade de 25%.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com os tratamentos em cinco repetições. A fitotoxicidade do tratamento foi avaliada pelo número de folhas/planta em comparação ao número de folhas/planta das plantas testemunhas, para todas as repetições.

A suscetibilidade das plantas ao herbicida foi avaliada de forma visual, comparando-se às plantas testemunhas. As avaliações foram feitas aos 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação (DAA) do tratamento.

Os dados obtidos na avaliação da fitotoxicidade nas folhas e os do controle químico das plantas foram expressos graficamente, por meio de suas médias, e as comparações entre os acessos foram feitas mediante o erro padrão destas médias.

3.3. Teores de clorofila *a*, *b* e total

No primeiro ensaio, para a determinação do teor de clorofila total foi utilizado o clorofilômetro portátil SPAD 502 (Minolta), que fornece o teor em unidades relativas (UR). Já no segundo ensaio, o procedimento para a extração e a determinação do teor de clorofila nas folhas foi realizado segundo o método de LINDER (1974), macerando-se 0,25

g de folhas em 25 ml de acetona 80%. Para a quantificação utilizou-se de um espectrofotômetro DU 640B (Beckman), nos comprimentos de onda de 645, 652 e 663 nm. O teor de clorofila expresso em mg de clorofila por grama de massa fresca de folha (mg/gMF) foi calculado usando-se das equações descritas por LINDER, 1974. Os teores de clorofila para os dois ensaios foram determinados na terceira folha totalmente expandida, a partir do ápice.

Os dados obtidos para os dois ensaios foram expressos graficamente por meio de suas médias, e as comparações entre os acessos foram feitas mediante o erro padrão destas médias.

3.4. Extração e quantificação de amostras de DNA do tecido vegetal

Plantas jovens, geralmente com a quarta folha expandida, tiveram folhas coletadas de cada um dos dez acessos em estudo, embaladas separadamente, mantidas em gelo e posteriormente estocadas a -20°C até o momento da extração do DNA total. O procedimento de extração e quantificação foi realizado no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP, seguindo-se o método descrito por LODHI et al. (1994) modificado para tubos de microcentrifuga (tipo eppendorf) em pequena escala.

Dez amostras de DNA foram extraídas de acordo com o protocolo: aproximadamente 0,1 grama de tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido com a ajuda de um almofariz e um pistilo de porcelana. Em seguida, foi adicionado 1 ml de tampão de extração (20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1,4 M NaCl e 2% (v/v) de CTAB) e 0,2% de β -mercaptoetanol. A mistura foi agitada e transferida para um tubo de microcentrifuga de 2 ml. Foram adicionados 10 mg de PVP (polyvinylpirrolidone - Sigma) e o tubo foi invertido suavemente por várias vezes para misturar bem o material e depois incubado a 60°C por 25 min e esfriado a temperatura ambiente. Foi adicionado 1 ml de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), agitando-se levemente os tubos, e em seguida centrifugado a $10.621 \times g$ por 15 min à temperatura ambiente. O sobrenadante

foi transferido para um novo tubo ao qual foi adicionado 0,5 volumes de NaCl 5M e 1,0 volume de etanol 95% gelado (-20°C). A solução foi armazenada a -80°C por 20 min, para total precipitação do DNA, e depois centrifugada a 4.460 x g por 5 min e, em seguida, a 10.621 x g por mais 5 min a 4°C para formação do “pellet” (precipitado). O sobrenadante foi descartado e o “pellet” limpo, lavado com etanol 75% gelado (4°C), reagindo aproximadamente por 1 min e, em seguida, centrifugado a 10.621 x g por 5 min a 4°C. Após descartar o etanol, o “pellet” de DNA foi seco e ressuspendido com 50 µl de tampão TE 10:1 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), tratado com 10 µl de RNase à concentração de 10 mg/ml e incubado a 37°C por 30 min. As amostras de DNA foram estocadas a -20°C.

A análise da qualidade das amostras de DNA extraído foi feita por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, utilizando-se o tampão de corrida TBE 1X (Tris 89 mM, H₃BO₃ 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,2), com brometo de etídio (0,5 µg/ml). Os fragmentos de DNA genômico foram visualizados sob luz UV e documentados em fotodocumentador modelo Gel Doc 2000 (Bio Rad). Para comparação do tamanho das bandas foi usado o padrão de tamanho molecular conhecido “1kb DNA Ladder” (Fermentas).

As amostras foram diluídas na proporção de 2 µl da solução estoque de DNA em 98 µl de água grau “Milli-Q” estéril e quantificadas em espectrofotômetro DU 640B (Beckman), medindo-se a absorbância em contraste com uma amostra de água grau “Milli-Q” estéril, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Para estimar a concentração do DNA total obtido utilizou-se o padrão de que uma unidade de absorbância a 260 nm equivale a 50 µg de DNA por ml de solução (SAMBROOK et al., 1989). A concentração final deixada como solução de trabalho para as análises moleculares foi de 10 ng/µl.

3.5. Aplicação da técnica de PCR - RFLP para o gene *psbA*

A técnica de RFLP foi realizada após a amplificação de uma região conservada do gene *psbA*, utilizando-se dos oligonucleotídeos iniciadores específicos descritos por CHEUNG et al. (1993), de acordo com as seguintes seqüências: P1 (5' ATGAGGGTTACAGATTTGGTC 3') e P2 (5' AGATTAGCACGGTTGATGATA 3').

As reações de amplificação foram conduzidas em um volume final de 20 µl, contendo: 18 µl de "Mix", constituída de tampão para PCR 10X 2 µl (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl), MgCl₂ 0,6 µl (1,5 mM), dNTP 0,5 µl (10 mM), Iniciadores 0,5 µl (1 pmol/µl), *Taq* DNA polimerase 0,3 µl (1,5 U), água grau "Milli-Q" estéril (q. s. p.) e 2 µl (20 ng) das amostras de DNA. Todas as reações de amplificação realizadas foram montadas em tubos de PCR (200 µl) estéreis. Para cada reação foi feito um controle negativo, no qual foi adicionada água grau "Milli-Q" estéril em substituição ao material genético.

As reações de amplificação foram realizadas usando-se um aparelho termociclador MJ Research, Inc., PTC-100™. O programa adotado para esta etapa de análise foi: 5 min a 95°C seguido de 40 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 55°C, 1 min a 72°C e em seguida 7 min a 72°C. A análise do produto amplificado foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em comparação ao padrão de tamanho molecular conhecido "1 kb Plus DNA Ladder" (Invitrogen).

3.5.1. Análise dos fragmentos de restrição

A análise dos fragmentos de restrição foi realizada com o produto de amplificação gerado para uma região crítica de resistência do gene *psbA*. A enzima de restrição utilizada foi a *MaeI*, com o seguinte corte de restrição: 5' C↓T A G 3' e 3' G A T↑C 5'.

A reação de restrição foi efetuada em um volume final de 10 µl, contendo produto amplificado 4 µl (20 ng), tampão 1X 1 µl (33 mM Tris-acetato (pH 7,9), 10 mM acetato de magnésio, 66 mM acetato de potássio, 0,1 mg/ml BSA), enzima *MaeI* (Fermentas)

0,2 µl (2 U) e água grau “Milli-Q” estéril (q. s. p.). A reação foi incubada por 3 h a 45°C. Foram feitas duas reações para cada produto de cada amostra, para no final obter um volume de 20 µl.

Após a reação de restrição foram utilizados 20 µl do produto digerido e 3 µl de tampão de carregamento, submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% (PAGE) com o TEB 1X. A eletroforese foi desenvolvida mantendo-se a voltagem constante de 40 V durante 15 h, em temperatura entre 4 a 6°C. Após a eletroforese, os géis foram incubados com tampão TEB 1X contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml), por 15 min e a visualização dos fragmentos gerados foi feita em um transiluminador, modelo Gel Doc 1000 (Bio Rad). Os tamanhos dos fragmentos foram comparados ao padrão de tamanho molecular conhecido “Mass Ruler™ DNA Ladder Low Range ready-to-use” (Fermentas).

Com o uso do “software” pDRAW (AcaClone Software), foi possível obter quantos fragmentos seriam gerados, com seus respectivos tamanhos.

3.6. Seqüenciamento e análise das seqüências

Para verificar a possível ocorrência de polimorfismo na seqüência do gene em estudo, foi realizado o seqüenciamento dos produtos amplificados com os iniciadores P1 e P2. A reação de seqüenciamento foi feita em um volume final de 10 µl consistindo de tampão 5X 3 µl (400 mM Tris-HCl, pH 9,0; 10 mM MgCl₂), Dynamic Terminator 1 µl (GE), iniciadores P1 e P2 0,5 µl (1 pmol/µl) utilizados separadamente, 100 ng do fragmento de DNA amplificado e água grau “Milli-Q” estéril (q. s. p.). As amostras foram levadas ao termociclador, utilizando-se o mesmo programa adotado para a técnica de PCR-RFLP.

Após a reação de PCR, as amostras foram purificadas por precipitação em etanol como segue: foram utilizados 80 µl de isopropanol 75% e deixado agir por 15 min a temperatura ambiente. Em seguida a solução foi centrifugada a 15°C por 45 min a 1699 x g. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200 µl de etanol 70%. A

solução foi novamente centrifugada a 15°C por 10 min a 1699 x g. O sobrenadante foi novamente descartado e as amostras foram espinadas, secas e armazenadas a -20°C até serem seqüenciadas.

Para o seqüenciamento, as amostras foram ressuspendidas em 9 µl de Hi-Di-Formamide (ABI Prism), desnaturadas a 95°C por 5 min e submetidas ao seqüenciamento automático de DNA utilizando o aparelho ABI 3700 DNA Analyzer-Applied Biosystems, em sistema capilar. Os fragmentos utilizados para a análise foram seqüenciados quatro vezes para confirmação dos resultados. As seqüências obtidas foram analisadas pelo “Sequencing Analysis 3.4” e, a montagem das seqüências, verificação da qualidade das bases dos cromatogramas e arquivos gerados no formato FASTA, foram realizados pelo pacote de programas “Phred/Phrap/Consed” (GORDON et al., 1998). A tradução de seqüência DNA/proteína foi realizada pela ferramenta de tradução “Swiss-Prot” (<http://br.expasy.org/tools/dna.html>). O programa de alinhamento ClustalW (<http://clustalw.genome.ad.jp>) foi utilizado para comparar as seqüências geradas neste experimento com as depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

3.7. Marcadores RAPD na análise da diversidade genética de *Digitaria nuda*

O procedimento para as reações de amplificação das amostras de DNA por RAPD encontra-se descrito em WILLIAMS et al. (1990). Foram testados 43 oligonucleotídeos iniciadores de seqüências arbitrárias contendo 10 bases cada, provenientes da coleção “The University of British Columbia - Nucleic Acid - Protein Service Unit”, mas somente vinte utilizados na análise, cujos números de acesso dos oligonucleotídeos à coleção bem como as respectivas seqüências, encontram-se descritos na Tabela 1.

As reações de amplificação foram conduzidas em um volume final de 20 µl, contendo: 19 µl de “Mix”, constituída de tampão para PCR 10X 2 µl (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl), MgCl₂ 0,7 µl (1,75 mM), dNTP 0,4 µl (10 mM), Iniciador 3 µl (5

ng/ μ l), *Taq* DNA polimerase 0,4 μ l (2 U), água grau “Milli-Q” estéril (q. s. p.) e 1 μ l (10 ng) das amostras de DNA. Todas as reações de amplificação realizadas foram montadas em tubos de PCR (200 μ l) estéreis. Para cada reação foi feito um controle negativo, no qual foi adicionada água grau “Milli-Q” estéril em substituição ao material genético.

As reações de amplificação foram realizadas usando-se um aparelho termociclador MJ Research, Inc., PTC-100TM. O programa adotado para esta etapa de análise foi: 2 min a 94°C seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 36°C, 2 min a 72°C e em seguida 5 min a 72°C.

Tabela 1. Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores arbitrários e seus respectivos números de acesso à coleção.

Oligonucleotídeos	Seqüências	Oligonucleotídeos	Seqüências
212	GCT GCG TGA C	265	CAG CTG TTC A
231	AGG GAG TTC C	274	GTT CCC GAG T
234	TCC ACG GAC G	278	GGT TCC AGC T
239	CTG AAG CGG A	282	GGG AAA GCA G
240	ATG TTC CAG G	285	GGG CGC CTA G
249	GCA TCT ACC G	288	CCT CCT TGA C
253	CCG TGC AGT A	290	CCG CGA GCA C
254	CGC CCC CAT T	292	AAA CAG CCC G
256	TGC AGT CGA A	293	TCG TGT TGC T
258	CAG GAT ACC A	296	CCG CTG GGA G

A análise dos amplicons foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1,5% utilizando-se o tampão de corrida TBE 1X com brometo de etídio e 3 μ l de tampão de carregamento (Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8), azul de bromofenol 0,02% e glicerol 50%). O

tempo de corrida eletroforética foi de aproximadamente 2 h a uma tensão de 85 V. Os amplicons foram comparados ao padrão “1kb DNA Ladder”, visualizados sob luz UV e documentados em fotodocumentador modelo Gel Doc 2000 (Bio Rad).

Por meio da análise do bandejamento produzido com o uso de cada oligonucleotídeo iniciador aleatório, foi conferido o parâmetro 1 para a presença de banda e 0 para a ausência de banda, permitindo a elaboração de uma matriz binária. Essa matriz foi utilizada para a construção de um filograma pelo “software” FreeTree Win 95/98/NT (HAMPL et al., 2001). A similaridade genética entre os acessos foi estimada pelo coeficiente de distância descrito por NEI (1986). Para o agrupamento dos dados da matriz filogenética foi utilizado o método da média das distâncias genéticas (UPGMA-Unweighted Pair Group Method for Arithmetic Averages) (SNEATH & SOKAL, 1973), sendo que, o filograma foi obtido com o auxílio do “software” TreeView (PAGE, 1996).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Eficácia agrônômica da ametrina no controle de *Digitaria nuda*

Pela análise comparativa morfológica, pode-se constatar que todos os acessos sob estudo correspondiam *D. nuda*, pois não apresentaram gluma na espiguetas, o que, segundo DIAS (2005a) possibilita a confirmação da espécie. Contudo, segundo CANTO-DOROW (2001b), *D. nuda* caracteriza-se pela ausência da gluma inferior e também por ter lema inferior com tricomas, ultrapassando seu ápice em 0,2-0,4 mm. Pelas dimensões das espiguetas, assemelha-se a *D. horizontalis*, da qual difere por ter gluma inferior, e pelo lema inferior com tricomas não ultrapassando o seu ápice.

Para cada ensaio realizado, foi estimada a média do número de folhas/planta, tanto das plantas utilizadas como testemunhas, como das plantas submetidas ao tratamento com ametrina. No primeiro ensaio, antes da aplicação da ametrina verificou-se diferença no número de folhas/planta apenas nos acessos 3, 13 e 14, sendo que os acessos 3 e 13, as plantas testemunhas apresentaram menores números de folhas do que as tratadas com ametrina, enquanto no acesso 14 ocorreu o inverso (Figura 2). Considerando a média das duas situações, pode-se observar que as plantas do acesso 8 apresentaram maiores números de folhas que as dos demais acessos, à exceção do acesso 7. Os demais acessos não diferenciaram entre si.

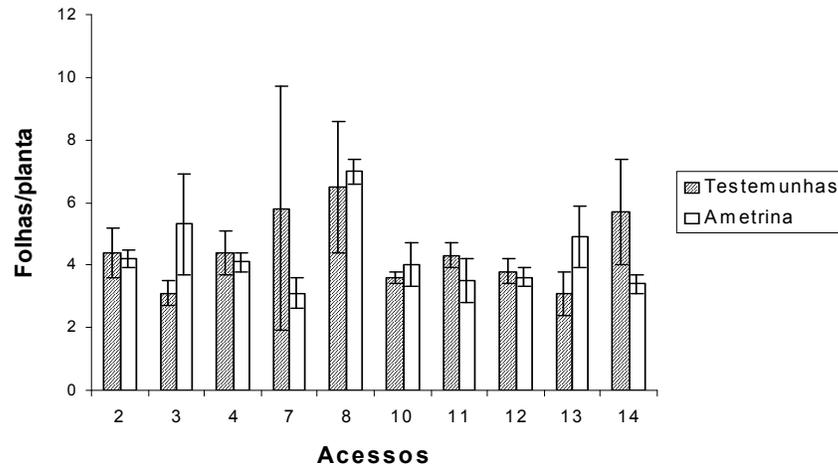


Figura 2. Relação número de folhas/planta dos acessos de *D. nuda* usadas como plantas testemunhas e no tratamento antes da aplicação da ametrina. Média de pelo menos três repetições \pm erro padrão.

No primeiro ensaio com o uso da ametrina, a avaliação feita aos 7 dias após a aplicação (DAA), mostrou um nível de controle acima de 90% para todos os acessos. Na avaliação realizada aos 14 DAA já se observou que os acessos 10 e 14 apresentaram repetições com rebrota, proporcionando menor controle. A média estimada para o acesso 10 foi igual à obtida para o acesso 14. Os demais acessos apresentaram uma média de controle de 100% em todas as repetições. Aos 21 e 28 DAA, esse comportamento se manteve, com os acessos 10 e 14 apresentando o menor controle. Esses resultados podem ser observados nas Figuras 3 e 4.

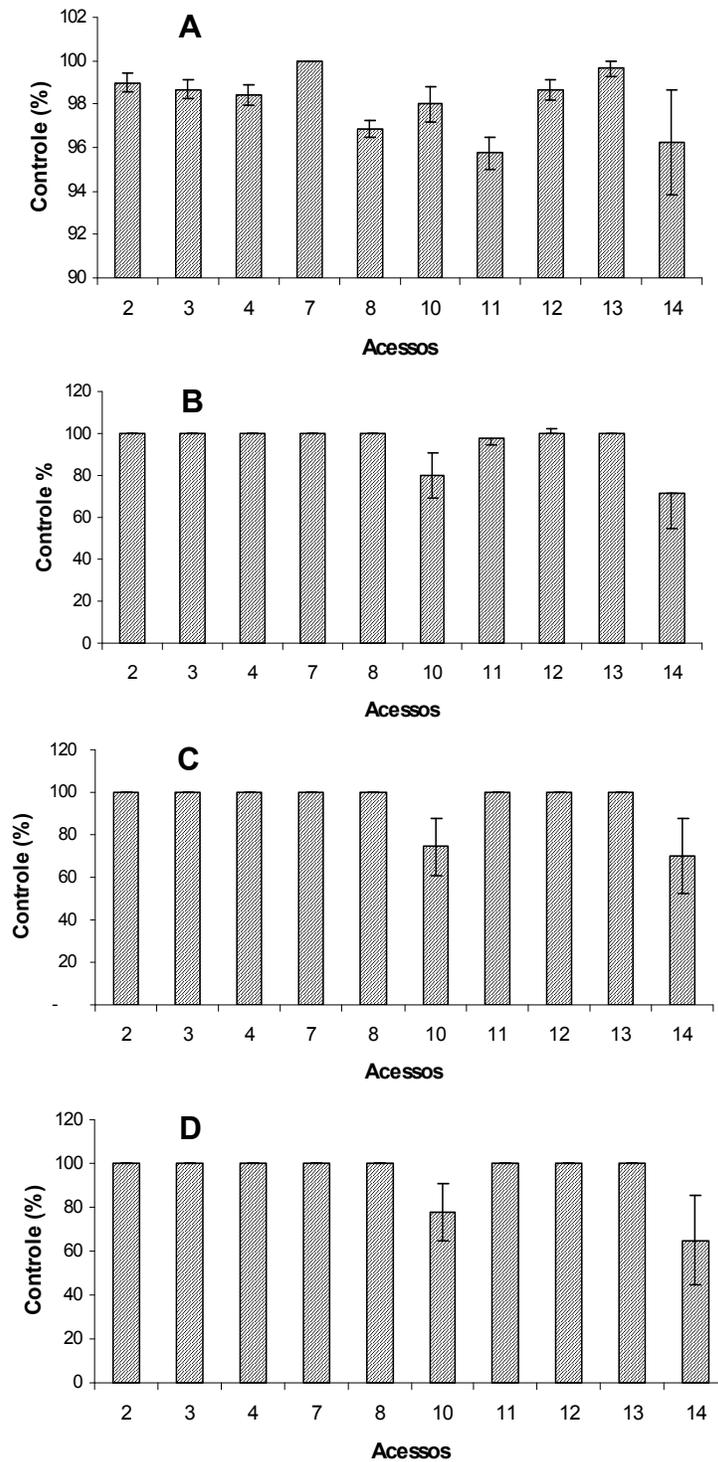


Figura 3. Porcentagem de controle visual dos acessos de *D. nuda*, avaliados aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) e 28 (D) DAA da ametryn na dose de 2400 g i.a./ha. Média de pelo menos três repetições \pm erro padrão.

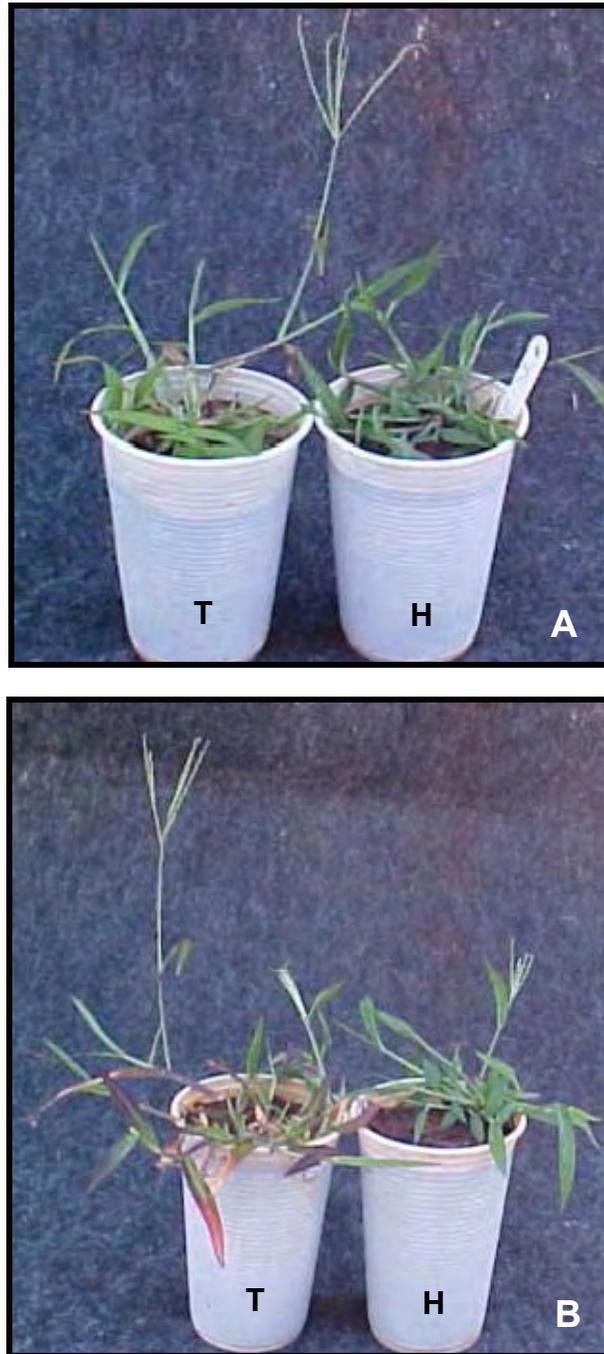


Figura 4. Rebrotas dos acessos 10 (A) e 14 (B) de *D. nuda* aos 28 DAA da ametrina. Planta testemunha (T); Tratamento com ametrina a 2400 g i.a./ha (H).

No segundo ensaio, a média do número de folhas/planta também foi estimada, como no primeiro ensaio. Antes da aplicação da ametrina verificou-se que, os acessos 11, 12 e 14 apresentaram diferenças no número de folhas/planta, comparando-os com os demais acessos. No acesso 11 o número de folhas/planta foi menor para as plantas testemunhas, enquanto nos acessos 12 e 14 as plantas submetidas ao tratamento apresentaram menor relação folhas/planta (Figura 5). Considerando a média das duas situações, pode-se observar que as plantas do acesso 7 apresentaram menores números de folhas que as dos demais acessos, à exceção do acesso 11. O acesso 4 foi o que obteve a maior média, à exceção dos acessos 2, 8 e 12. Os demais acessos não diferenciaram entre si.

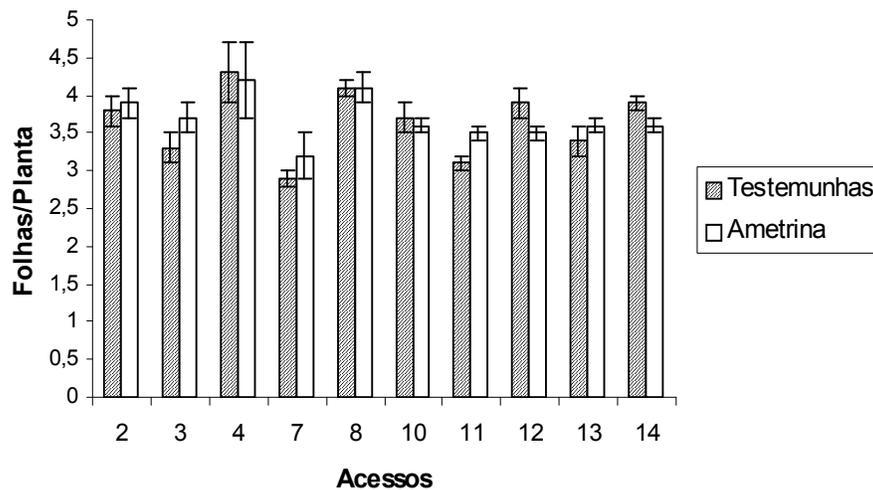


Figura 5. Relação número de folhas/planta dos acessos de *D. nuda* usadas como plantas testemunhas e no tratamento antes da aplicação da ametrina. Média de cinco repetições \pm erro padrão.

Após o tratamento feito com ametrina nos acessos de *D. nuda* estudados, na avaliação realizada aos 7 DAA observou-se que os acessos 2, 3, 4, 8, 10 e 11 apresentaram um nível de controle acima de 90%, considerado um excelente controle, enquanto os demais acessos apresentaram 100%. Nas avaliações realizadas a partir

dos 14 DAA, todos os acessos apresentaram 100% de controle, não havendo qualquer rebrota até o término do período experimental (Figuras 6 e 7).

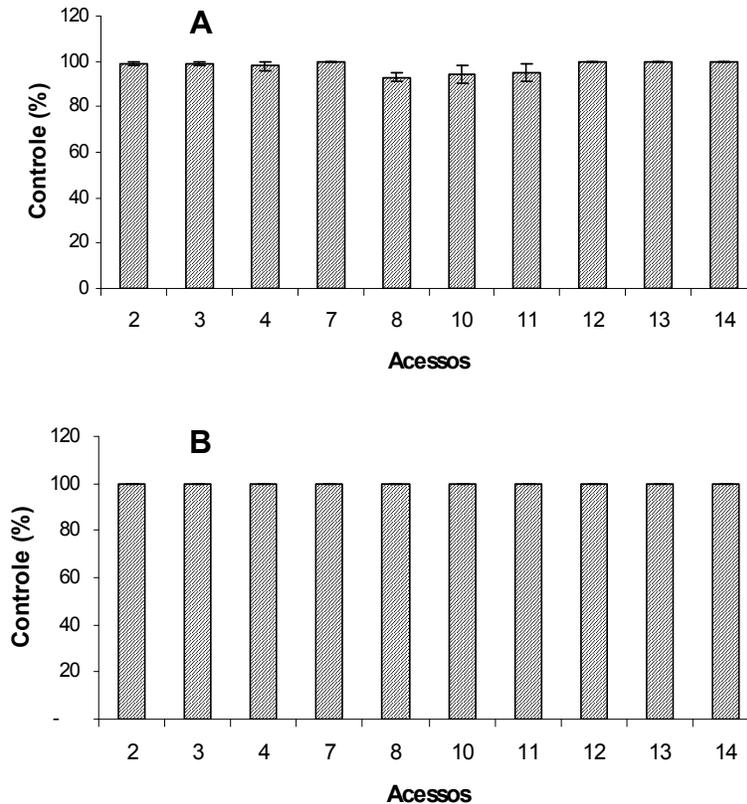


Figura 6. Porcentagem de controle visual dos acessos de *D. nuda*, avaliados aos 7 (A) e 14 (B) DAA da ametrina na dose de 2400 g i.a./ha. Média de cinco repetições \pm erro padrão.

Com os resultados obtidos, pode-se inferir que a ametrina na dose de 2400 g i.a./ha proporcionou eficiente controle dos acessos de *D. nuda* estudados no presente trabalho. DIAS et al. (2005a) estudando a eficácia de herbicidas no controle de *D. nuda* verificaram que os herbicidas pertencentes aos grupos químicos das triazinas (ametrina), triazinonas (metribuzin) e dos isoxazolinonas (isoxaflutole) foram aqueles que apresentaram os melhores níveis de controle.

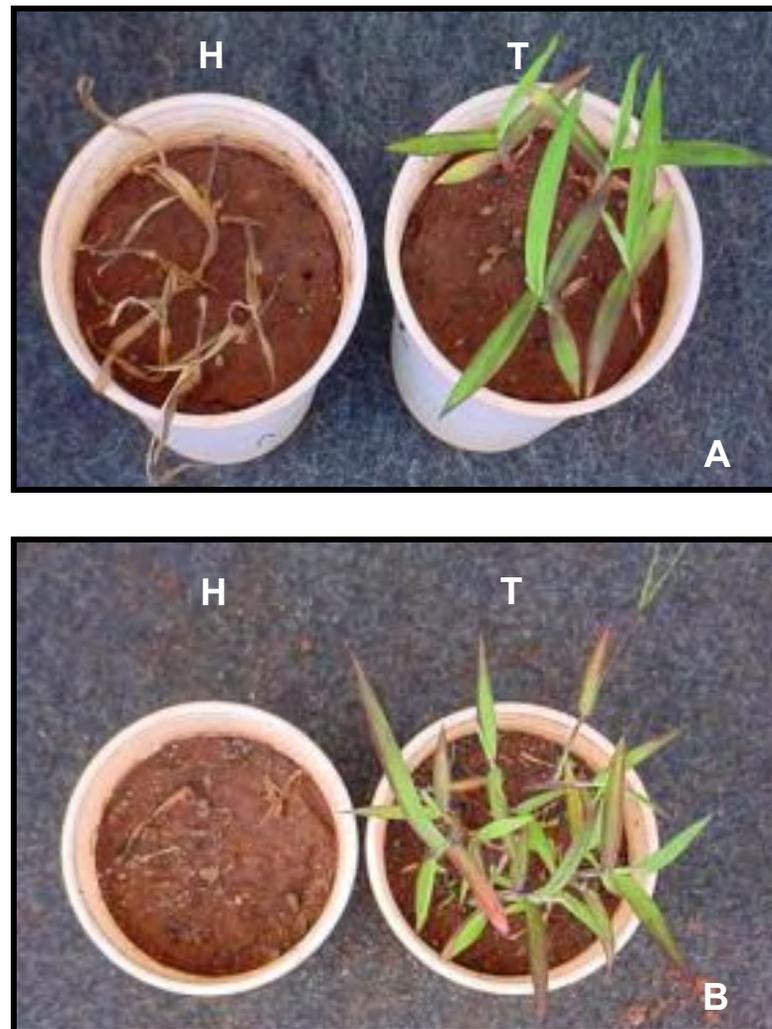


Figura 7. Suscetibilidade dos acessos de *D. nuda* submetidos ao tratamento com ametryn (2400 g i.a./ha) avaliados aos 7 (A) e 14 (B) DAA. Tratamento com ametryn (H); Plantas testemunhas (T).

Um estudo feito por DIAS et al. (2005b) em populações de *Digitaria* spp. submetidas à pressão de seleção por herbicidas, verificaram que a *D. nuda* apresentou um controle satisfatório a partir dos 14 DAA do herbicida ametryn.

De maneira geral, pode-se afirmar que não houve caso de tolerância nos acessos de *D. nuda* estudados na região de São Joaquim da Barra, uma vez que a repetição do ensaio proporcionou 100% de controle já a partir dos 14 DAA do herbicida,

descartando, desta forma, a hipótese de resistência a esse herbicida. Os resultados de escape obtidos no primeiro ensaio podem ser resultantes de uma diferença do estágio fenológico das plantas, sobrevivendo aquelas mais desenvolvidas ou em estádios de desenvolvimento mais adiantados.

4.2. Teor de clorofila das folhas

No primeiro ensaio realizado, aos 7 DAA observou-se que a ametrina reduziu o teor relativo de clorofila total nas folhas das plantas tratadas com o herbicida de todos os acessos estudados, à exceção do acesso 14 para o qual não se verificou efeito do tratamento. Aos 14 DAA com a morte das plantas em decorrência da aplicação da ametrina, pode-se determinar o teor relativo de clorofila total apenas nos acessos 10 e 14, os quais apresentaram plantas sobreviventes. Para esses dois acessos não se verificou efeito diferenciado no tratamento. Esses resultados se mantiveram até os 28 DAA. Comparando-se os acessos sem aplicação da ametrina, verificou-se, de maneira geral que o teor relativo de clorofila total nas folhas dos acessos 4 e 7 foi menor que os demais acessos a partir dos 14 DAA, enquanto o acesso 12 apresentou o mesmo comportamento dos 14 aos 21 DAA. Esses resultados podem ser observados pela Figura 8.

Nos acessos 10 e 14 pode-se inferir que esses acessos não foram afetados pelo herbicida, uma vez que foi constatado teor relativo de clorofila total semelhante ao das testemunhas.

HASHEM et al. (2001) em estudo com biótipos de *Raphanus raphanistrum*, verificaram que houve uma redução de 97% de clorofila nas folhas do biótipo suscetível após 24 h da aplicação de triazina, comparando-se com redução de 9% dos biótipos resistentes, indicando que o mecanismo de ação do herbicida está envolvido no sítio de ação.

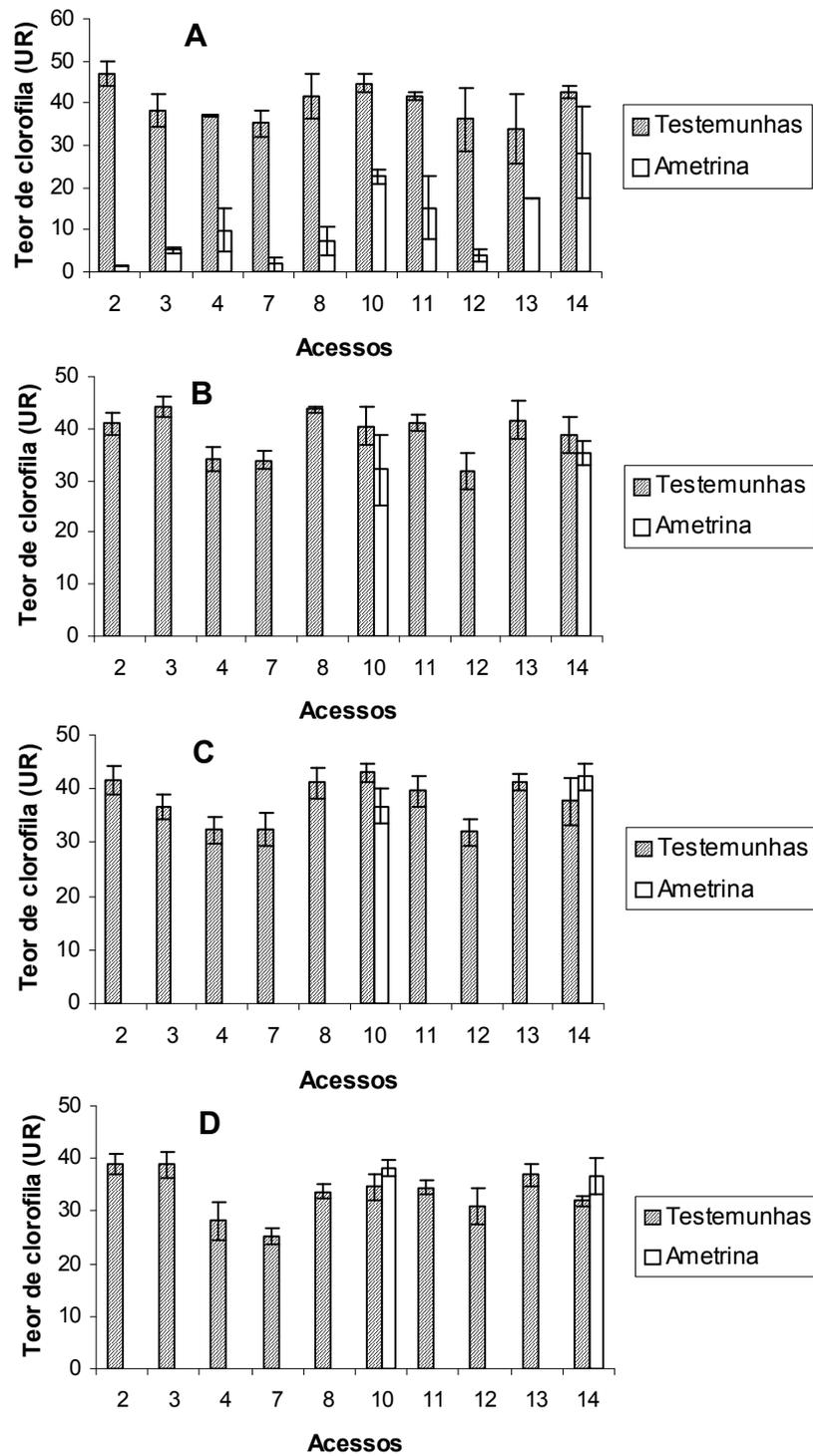


Figura 8. Teor de clorofila total (UR) das folhas dos acessos de *D. nuda* avaliados aos 7 (A), 14 (B), 21 (C) e 28 (D) DAA da ametrina. Média de pelo menos três repetições \pm erro padrão.

No segundo ensaio, verificou-se tendência de maior teor de clorofilas *a*, *b* e total nas folhas das plantas testemunhas dos acessos 4 e 7, quando comparado aos demais acessos, à exceção do acesso 2 que também apresentou maior teor de clorofila *b*, enquanto os acessos 8 e 10 apresentaram menores teores (Figura 9).

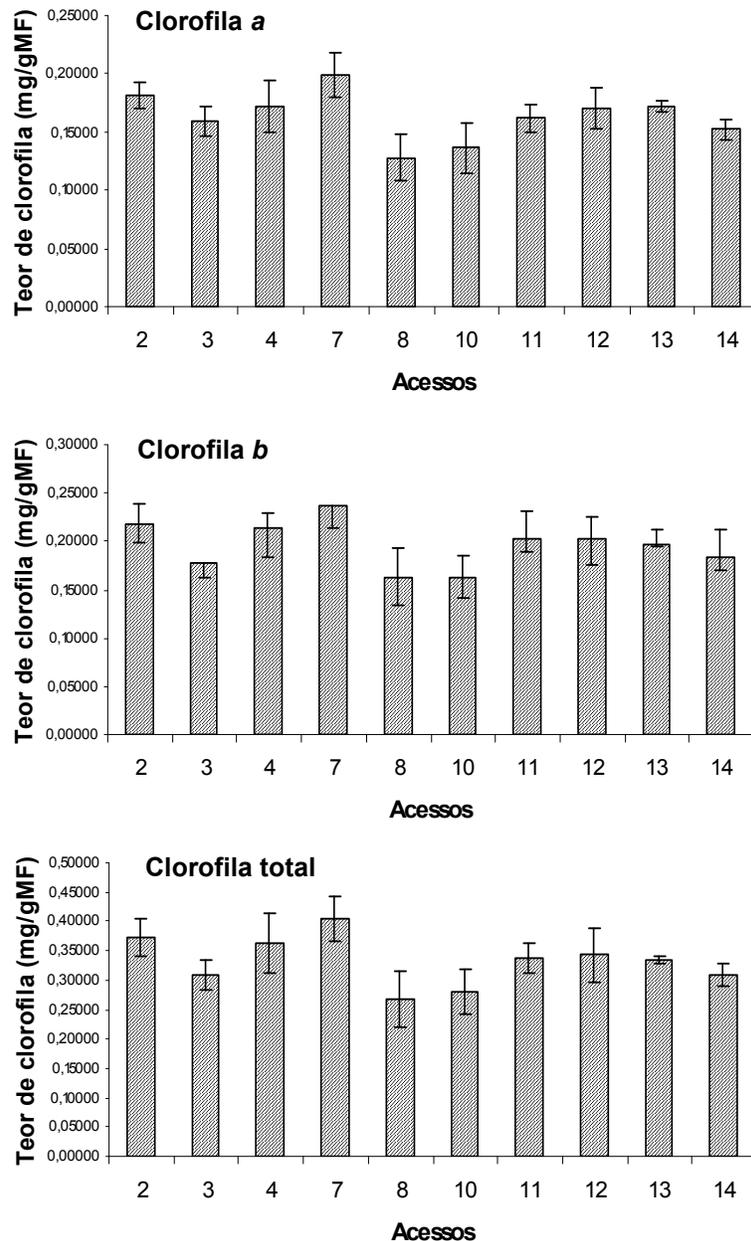


Figura 9. Teor de clorofilas *a*, *b* e total (mg/gMF) das folhas das plantas testemunhas dos acessos de *D. nuda*. Média de três repetições \pm erro padrão.

Esses resultados contrariam os obtidos no primeiro ensaio, demonstrando que as variações nos teores não foram características inerentes à espécie, mas sim, provavelmente, uma resposta ao meio, talvez ao teor de nitrogênio no substrato.

Esta análise foi realizada para comparar os resultados apenas das plantas testemunhas, uma vez que, no segundo ensaio, as plantas submetidas ao tratamento apresentaram um controle de 100%.

Segundo FREIRE (2000), a redução na concentração de clorofila tem como consequência a redução na capacidade fotossintética das folhas. Dessa forma, ocorre a redução na produção de assimilados necessários ao crescimento das plantas.

4.3. Análise dos fragmentos de restrição dos produtos amplificados

Com o objetivo de se detectar possíveis polimorfismos em uma região conservada do gene *psbA* que codifica a proteína D1 no FS II, utilizou-se a técnica de PCR-RFLP. O produto de amplificação obtido com o uso dos iniciadores específicos P1 e P2 resultou em um único fragmento de tamanho de 267 pb para todos os acessos de *D. nuda* estudados, como pode ser observado pela Figura 10.

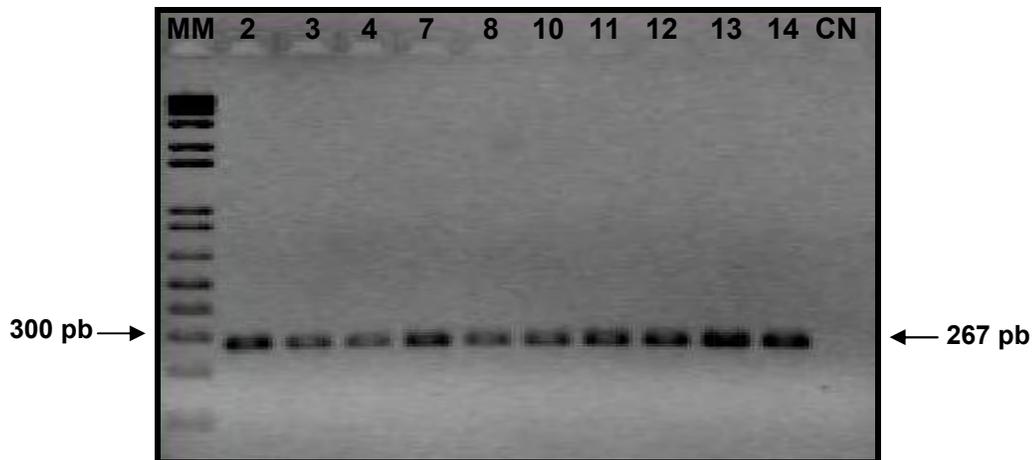


Figura 10. Amplificação dos acessos de *D. nuda* com os iniciadores P1 e P2. MM = marcador molecular (“1kb Plus DNA Ladder”); CN = controle negativo. Os números acima das canaletas referem-se aos acessos.

Este produto de amplificação foi submetido à análise de restrição com a enzima *MaeI*, resultando em dois fragmentos de DNA: 183 e 84 pb em todos os acessos em estudo. Porém, não foi possível a digestão total do produto de amplificação sendo observado também o fragmento de aproximadamente 267 pb (Figura 11). Este fato pode estar relacionado à não purificação do produto de amplificação antecedendo a reação de restrição. A ocorrência de digestão parcial deste produto ocorreu para todas as amostras que foram submetidas à análise de restrição. Vários testes para a otimização da reação de restrição na tentativa de uma digestão completa, foram feitos, desde alteração de temperatura de 37°C para 45°C e período de tempo de incubação, sendo incubadas por 3, 4 e 16 h, como também o volume (10 U/μl) utilizado da enzima *MaeI*: 0,2; 0,3; 0,5 e 1,0 μl. O melhor resultado obtido pode ser observado pela Figura 11, com a nitidez dos fragmentos digeridos, o que não aconteceu com os outros testes realizados.

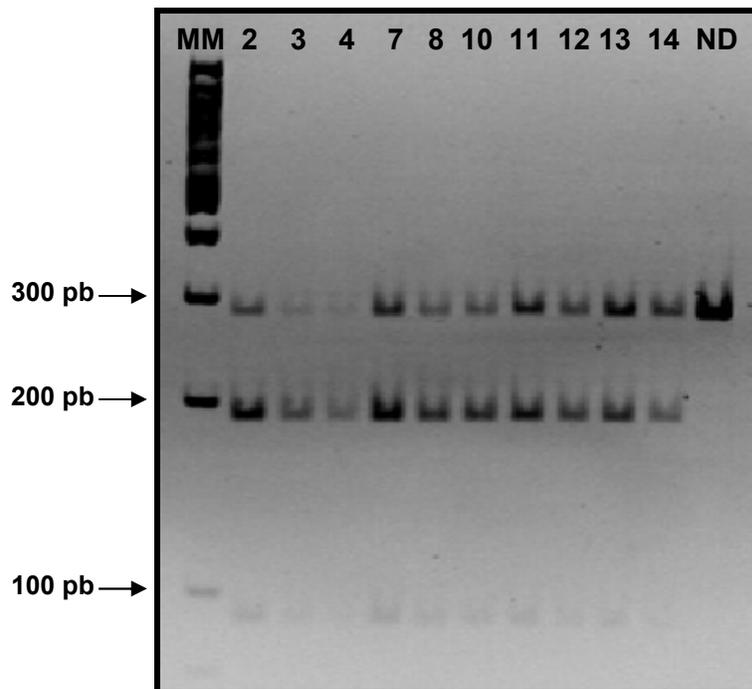


Figura 11. Produto de amplificação de uma região conservada do gene *psbA* digerido com a enzima *MaeI*. MM = marcador molecular (“Mass Ruler™ DNA Ladder Low Range ready-to-use”); ND = fragmento não digerido. Os números acima das canaletas referem-se aos acessos.

FREY et al. (1999), ao estudarem a relação entre o fenótipo e o genótipo suscetível à triazina, verificaram que o padrão de restrição obtido em *S. vulgaris* e *S. nigrum* foi diferente do encontrado em *A. retroflexus* e *Chenopodium album*, no qual o genótipo suscetível produziu fragmentos de 189 e 88 pb. Esse resultado foi semelhante ao encontrado em *D. nuda*.

Nos estudos com plantas daninhas, a técnica de PCR-RFLP vem sendo empregada para estimar, precocemente, a ocorrência relativa de resistência em populações de campo, sujeitas a níveis variáveis de pressão com herbicidas. No presente trabalho, os resultados obtidos foram comparados à resposta fenotípica de *D. nuda*, após aplicação de ametrina. Essa técnica foi adotada como um diagnóstico molecular, desenvolvido para a região do gene *psbA* de outras plantas daninhas, incluindo *Brassica napus*, *Chenopodium* spp. e *Amaranthus* spp. (CHEUNG et al., 1993).

Segundo FREY et al. (1999), o padrão de restrição em genótipo resistente de *S. vulgaris*, no qual este tipo de análise também foi aplicado para a região de resistência do gene *psbA*, difere do suscetível, pois a enzima *MaeI* reconhece sítios de cortes diferentes, gerando fragmentos de tamanhos diferentes. De acordo com estes autores, a resistência à triazina é obtida por uma mutação de ponto que elimina o sítio de reconhecimento da enzima *MaeI* na posição 88 pb, o que resulta em dois fragmentos de restrição em indivíduos portadores da mutação de ponto que confere resistência à triazina e em três fragmentos naqueles que não sofreram essa mutação.

Pela Figura 11, observa-se que o perfil de restrição dos fragmentos amplificados para todos os acessos foi semelhante ao obtido para *A. retroflexus* e *C. album*, com a presença de dois fragmentos, 183 e 84 pb, caracterizando todos os acessos como suscetíveis ao herbicida ametrina.

FRAGA & TASENDE (2003), ao estudarem biótipos de *Sonchus oleraceus* resistentes ao simazine, pela análise de restrição com a *MaeI*, verificaram que o fragmento de 413 pb amplificado por PCR em todos os biótipos apresentava padrões de restrição diferentes quando comparados aos biótipos suscetíveis.

Estudos feitos com biótipos resistentes e suscetíveis à triazina em *S. nigrum* (STANKIEWICZ et al., 2001) e *A. blitoides* (SIBONY & RUBIN, 2003), pela digestão de um fragmento do gene *psbA* digerido com a enzima de restrição *Bst*XI mostraram que, as populações resistentes apresentavam padrões de bandas diferentes daqueles obtidos para as populações suscetíveis, que apresentavam apenas os fragmentos não digeridos.

Os resultados obtidos no presente estudo com esta técnica estão condizentes aos experimentos de campo realizados, pois os padrões de bandas gerados pela análise de restrição são compatíveis ao fenótipo suscetível, passíveis de serem controlados pelo herbicida.

Portanto, pode-se dizer que esta base molecular é eficiente na detecção de biótipos suscetíveis e resistentes à triazina, dado que a mutação ocorre na seqüência de reconhecimento da enzima, alterando seu padrão de restrição.

Mesmo não tendo obtido polimorfismo na análise de restrição para os acessos de *D. nuda* em estudo, foi realizado o seqüenciamento, como mais uma ferramenta de análise molecular desta região do gene *psbA*, bem como para verificar outras possíveis modificações e até mesmo a detecção de um outro marcador.

4.4. Análise dos fragmentos seqüenciados

Os produtos gerados após a amplificação com os iniciadores específicos P1 e P2, para os dez acessos de *D. nuda* estudados, foram submetidos ao seqüenciamento. A seqüência obtida destes produtos de amplificação foi depositada no GenBank, a qual obteve-se o número de acesso EF633341. Pela análise comparativa da seqüência do gene em estudo com a de outros organismos depositados no GenBank, pode-se constatar mutação, seja espontânea ou provocada. Muitas vezes ocorre também os SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), que podem ser silenciosos ou ocasionar alterações nos aminoácidos.

Pela análise das seqüências obtidas dos dez acessos, não houve alteração dos aminoácidos na posição de corte da enzima, provando que esta técnica corrobora com os resultados obtidos pela técnica de PCR-RFLP.

Para a análise da seqüência da região conservada do gene *psbA* obtida dos acessos de *D. nuda* estudados, tomou-se como referência algumas seqüências já depositadas no GenBank. A seqüência dos nucleotídeos e dos aminoácidos foi comparada e alinhada com a seqüência dos nucleotídeos e aminoácidos do gene *psbA* de *S. vulgaris* (ref. AF061287) e *Oryza sativa* (ref. M36191) resultando em 100% de similaridade (Figuras 12 e 13).

Observou-se durante a análise das seqüências a presença de uma mutação de ponto, ou seja, um SNP, para o acesso 11, como pode ser observado pela Figura 12. Essa mutação ocorreu na posição 48 da seqüência de nucleotídeos do fragmento e foi constatada por quatro repetições de seqüenciamento com qualidade “Phred” 37 de diferentes produtos de ampliações, com o iniciador P2. Essa seqüência foi depositada no GenBank, obtendo-se o número de acesso EF633342.

O SNP tem sido muito utilizado na análise molecular para identificar casos de resistência a herbicidas. Esse método já foi usado com sucesso para verificar resistências à sethoxydim e trifluralin (DÉLYE et al., 2002; DÉLYE et al., 2004).

Pelo trabalho de FREY et al. (1999), pode-se confirmar uma mutação de ponto para o biótipo resistente à triazina em *S. vulgaris*, pelo alinhamento feito em comparação à espécie *O. sativa*, mostrando o polimorfismo gerado quando há a troca de aminoácido serina (AGT) pela glicina (GGT). Neste mesmo trabalho verificou-se, também, a ocorrência de polimorfismos com mutações silenciosas em diferentes espécies de plantas.

A substituição de uma guanina por uma timina, ocasionou a mudança do aminoácido triptofano (TGG) pelo aminoácido leucina (TTG), resultando em biótipos resistentes de *A. blitoides* a quatro grupos de herbicidas inibidores da ALS (SIBONY & RUBIN, 2003).

TIAN & DARMENCY (2006), fez uso do SNP para identificar resistência de plantas à triazina, utilizando do método de PCR alelo específico.

```

Digitaria nuda Ac 14      ----GGGTTACAGATTTGGTCAAGAAGAAGAGACCTATAATATTTGTGGCT
Digitaria nuda Ac 2      ----GGGTTACAGATTTGGTCAAGAAGAAGAGACCTATAATATTTGTGGCT
Digitaria nuda Ac 3      ----GGGTTACAGATTTGGTCAAGAAGAAGAGACCTATAATATTTGTGGCT
Digitaria nuda Ac 4      ----GGGTTACAGATTTGGTCAAGAAGAAGAGACCTATAATATTTGTGGCT
Digitaria nuda Ac 7      ----GGGTTACAGATTTGGTCAAGAAGAAGAGACCTATAATATTTGTGGCT
Digitaria nuda Ac 8      ----GGGTTACAGATTTGGTCAAGAAGAAGAGACCTATAATATTTGTGGCT
Digitaria nuda Ac 10     ----GGGTTACAGATTTGGTCAAGAAGAAGAGACCTATAATATTTGTGGCT
Digitaria nuda Ac 12     ----GGGTTACAGATTTGGTCAAGAAGAAGAGACCTATAATATTTGTGGCT
Digitaria nuda Ac 13     ----GGGTTACAGATTTGGTCAAGAAGAAGAGACCTATAATATTTGTGGCT
Digitaria nuda Ac 11     ----GGGTTACAGATTTGGTCAAGAAGAAGAGACCTATAATATTTGTGGCT
gi|343211_257-1318_O.sativa.L.
gi|3128398_1-277_Senecio_vulga
*****

Digitaria nuda Ac 14      GCTCACGGTTATTTTGGTCGATTAATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAA
Digitaria nuda Ac 2      GCTCACGGTTATTTTGGTCGATTAATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAA
Digitaria nuda Ac 3      GCTCACGGTTATTTTGGTCGATTAATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAA
Digitaria nuda Ac 4      GCTCACGGTTATTTTGGTCGATTAATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAA
Digitaria nuda Ac 7      GCTCACGGTTATTTTGGTCGATTAATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAA
Digitaria nuda Ac 8      GCTCACGGTTATTTTGGTCGATTAATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAA
Digitaria nuda Ac 10     GCTCACGGTTATTTTGGTCGATTAATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAA
Digitaria nuda Ac 12     GCTCACGGTTATTTTGGTCGATTAATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAA
Digitaria nuda Ac 13     GCTCACGGTTATTTTGGTCGATTAATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAA
Digitaria nuda Ac 11     GCTCACGGTTATTTTGGTCGATTAATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAA
gi|343211_257-1318_O.sativa.L.
gi|3128398_1-277_Senecio_vulga
*****

Digitaria nuda Ac 14      CTCTCGTTCCTTACACTTCTTCTTGGCTGCTTGGCCTGTAGTAGGGATCT
Digitaria nuda Ac 2      CTCTCGTTCCTTACACTTCTTCTTGGCTGCTTGGCCTGTAGTAGGGATCT
Digitaria nuda Ac 3      CTCTCGTTCCTTACACTTCTTCTTGGCTGCTTGGCCTGTAGTAGGGATCT
Digitaria nuda Ac 4      CTCTCGTTCCTTACACTTCTTCTTGGCTGCTTGGCCTGTAGTAGGGATCT
Digitaria nuda Ac 7      CTCTCGTTCCTTACACTTCTTCTTGGCTGCTTGGCCTGTAGTAGGGATCT
Digitaria nuda Ac 8      CTCTCGTTCCTTACACTTCTTCTTGGCTGCTTGGCCTGTAGTAGGGATCT
Digitaria nuda Ac 10     CTCTCGTTCCTTACACTTCTTCTTGGCTGCTTGGCCTGTAGTAGGGATCT
Digitaria nuda Ac 12     CTCTCGTTCCTTACACTTCTTCTTGGCTGCTTGGCCTGTAGTAGGGATCT
Digitaria nuda Ac 13     CTCTCGTTCCTTACACTTCTTCTTGGCTGCTTGGCCTGTAGTAGGGATCT
Digitaria nuda Ac 11     CTCTCGTTCCTTACACTTCTTCTTGGCTGCTTGGCCTGTAGTAGGGATCT
gi|343211_257-1318_O.sativa.L.
gi|3128398_1-277_Senecio_vulga
*****

Digitaria nuda Ac 14      GGFTCACTGCTTTAGGTATAGTACTATGGCATTCAACCTAAATGGTTTC
Digitaria nuda Ac 2      GGFTCACTGCTTTAGGTATAGTACTATGGCATTCAACCTAAATGGTTTC
Digitaria nuda Ac 3      GGFTCACTGCTTTAGGTATAGTACTATGGCATTCAACCTAAATGGTTTC
Digitaria nuda Ac 4      GGFTCACTGCTTTAGGTATAGTACTATGGCATTCAACCTAAATGGTTTC
Digitaria nuda Ac 7      GGFTCACTGCTTTAGGTATAGTACTATGGCATTCAACCTAAATGGTTTC
Digitaria nuda Ac 8      GGFTCACTGCTTTAGGTATAGTACTATGGCATTCAACCTAAATGGTTTC
Digitaria nuda Ac 10     GGFTCACTGCTTTAGGTATAGTACTATGGCATTCAACCTAAATGGTTTC
Digitaria nuda Ac 12     GGFTCACTGCTTTAGGTATAGTACTATGGCATTCAACCTAAATGGTTTC
Digitaria nuda Ac 13     GGFTCACTGCTTTAGGTATAGTACTATGGCATTCAACCTAAATGGTTTC
Digitaria nuda Ac 11     GGFTCACTGCTTTAGGTATAGTACTATGGCATTCAACCTAAATGGTTTC
gi|343211_257-1318_O.sativa.L.
gi|3128398_1-277_Senecio_vulga
*****

Digitaria nuda Ac 14      AATTTCAACCAATCTGTAGTTGATAGCCAAAGGTCGGGTTATTAATACTTG
Digitaria nuda Ac 2      AATTTCAACCAATCTGTAGTTGATAGCCAAAGGTCGGGTTATTAATACTTG
Digitaria nuda Ac 3      AATTTCAACCAATCTGTAGTTGATAGCCAAAGGTCGGGTTATTAATACTTG
Digitaria nuda Ac 4      AATTTCAACCAATCTGTAGTTGATAGCCAAAGGTCGGGTTATTAATACTTG
Digitaria nuda Ac 7      AATTTCAACCAATCTGTAGTTGATAGCCAAAGGTCGGGTTATTAATACTTG
Digitaria nuda Ac 8      AATTTCAACCAATCTGTAGTTGATAGCCAAAGGTCGGGTTATTAATACTTG
Digitaria nuda Ac 10     AATTTCAACCAATCTGTAGTTGATAGCCAAAGGTCGGGTTATTAATACTTG
Digitaria nuda Ac 12     AATTTCAACCAATCTGTAGTTGATAGCCAAAGGTCGGGTTATTAATACTTG
Digitaria nuda Ac 13     AATTTCAACCAATCTGTAGTTGATAGCCAAAGGTCGGGTTATTAATACTTG
Digitaria nuda Ac 11     AATTTCAACCAATCTGTAGTTGATAGCCAAAGGTCGGGTTATTAATACTTG
gi|343211_257-1318_O.sativa.L.
gi|3128398_1-277_Senecio_vulga
*****

Digitaria nuda Ac 14      GGCTGATATCATCAACCGTGC-----
Digitaria nuda Ac 2      GGCTGATATCATCAACCGTGC-----
Digitaria nuda Ac 3      GGCTGATATCATCAACCGTGC-----
Digitaria nuda Ac 4      GGCTGATATCATCAACCGTGC-----
Digitaria nuda Ac 7      GGCTGATATCATCAACCGTGC-----
Digitaria nuda Ac 8      GGCTGATATCATCAACCGTGC-----
Digitaria nuda Ac 10     GGCTGATATCATCAACCGTGC-----
Digitaria nuda Ac 12     GGCTGATATCATCAACCGTGC-----
Digitaria nuda Ac 13     GGCTGATATCATCAACCGTGC-----
Digitaria nuda Ac 11     GGCTGATATCATCAACCGTGC-----
gi|343211_257-1318_O.sativa.L.
gi|3128398_1-277_Senecio_vulga
*****

```

Figura 12. Alinhamento da seqüência dos nucleotídeos de uma região do gene *psbA* de *D. nuda*, tendo referência as espécies *S. vulgaris* (ref. AF061287) e *O. sativa* (ref. M36191). A seta indica o acesso e a posição que sofreu uma mudança de base C-T. O retângulo indica a seqüência de corte da enzima *MaeI*.

O SNP ocorrido alterou o aminoácido na posição 16 do fragmento, de uma alanina codificada pelo códon GCT para valina codificada por GTT, dada à mudança de bases de C (citosina) para T (timina), comparado com as seqüências dos aminoácidos dos outros acessos (Figura 13), porém a substituição de uma alanina por uma valina não altera a conformação da proteína (score zero).

Oryza_sativa	GVAGVFGGSLFSAMHGSLVTSSLIRETTENESANEGYRFGQEEETYNIIVA
Senecio_vulgaris	-----EGYRFGQEEETYNIIVA
Digitaria_nuda_Acc_2	-----GYRFGQEEETYNIIVA
Digitaria_nuda_Acc_3	-----GYRFGQEEETYNIIVA
Digitaria_nuda_Acc_4	-----GYRFGQEEETYNIIVA
Digitaria_nuda_Acc_7	-----GYRFGQEEETYNIIVA
Digitaria_nuda_Acc_8	-----GYRFGQEEETYNIIVA
Digitaria_nuda_Acc_10	-----GYRFGQEEETYNIIVA
Digitaria_nuda_Acc_12	-----GYRFGQEEETYNIIVA
Digitaria_nuda_Acc_13	-----GYRFGQEEETYNIIVA
Digitaria_nuda_Acc_14	-----GYRFGQEEETYNIIVA
Digitaria_nuda_Acc_11	-----GYRFGQEEETYNIIVA

Oryza_sativa	AHG YFGRLIFQYASFNNRSRLHFFLAAWPVVGIWFTALGISTMAFNLNGF
Senecio_vulgaris	AHG YFGRLIFQYASFNNRSRLHFFLAAWPVVGIWFTALGISTMAFNLNGF
Digitaria_nuda_Acc_2	AHG YFGRLIFQYASFNNRSRLHFFLAAWPVVGIWFTALGISTMAFNLNGF
Digitaria_nuda_Acc_3	AHG YFGRLIFQYASFNNRSRLHFFLAAWPVVGIWFTALGISTMAFNLNGF
Digitaria_nuda_Acc_4	AHG YFGRLIFQYASFNNRSRLHFFLAAWPVVGIWFTALGISTMAFNLNGF
Digitaria_nuda_Acc_7	AHG YFGRLIFQYASFNNRSRLHFFLAAWPVVGIWFTALGISTMAFNLNGF
Digitaria_nuda_Acc_8	AHG YFGRLIFQYASFNNRSRLHFFLAAWPVVGIWFTALGISTMAFNLNGF
Digitaria_nuda_Acc_10	AHG YFGRLIFQYASFNNRSRLHFFLAAWPVVGIWFTALGISTMAFNLNGF
Digitaria_nuda_Acc_12	AHG YFGRLIFQYASFNNRSRLHFFLAAWPVVGIWFTALGISTMAFNLNGF
Digitaria_nuda_Acc_13	AHG YFGRLIFQYASFNNRSRLHFFLAAWPVVGIWFTALGISTMAFNLNGF
Digitaria_nuda_Acc_14	AHG YFGRLIFQYASFNNRSRLHFFLAAWPVVGIWFTALGISTMAFNLNGF
Digitaria_nuda_Acc_11	VHG YFGRLIFQYASFNNRSRLHFFLAAWPVVGIWFTALGISTMAFNLNGF

Oryza_sativa	NFNQSVVDSQGRVINTWADIINRANLGM EVMHERNAHNFPLDLAALAEVPS
Senecio_vulgaris	NFNQSVVDSQGRVINTWADIINRANL-----
Digitaria_nuda_Acc_2	NFNQSVVDSQGRVINTWADIINR-----
Digitaria_nuda_Acc_3	NFNQSVVDSQGRVINTWADIINR-----
Digitaria_nuda_Acc_4	NFNQSVVDSQGRVINTWADIINR-----
Digitaria_nuda_Acc_7	NFNQSVVDSQGRVINTWADIINR-----
Digitaria_nuda_Acc_8	NFNQSVVDSQGRVINTWADIINR-----
Digitaria_nuda_Acc_10	NFNQSVVDSQGRVINTWADIINR-----
Digitaria_nuda_Acc_12	NFNQSVVDSQGRVINTWADIINR-----
Digitaria_nuda_Acc_13	NFNQSVVDSQGRVINTWADIINR-----
Digitaria_nuda_Acc_14	NFNQSVVDSQGRVINTWADIINR-----
Digitaria_nuda_Acc_11	NFNQSVVDSQGRVINTWADIINR-----

Figura 13. Alinhamento da seqüência dos aminoácidos de uma região do gene *psbA* de *D. nuda*, tendo referência as espécies *S. vulgaris* (ref. AF061287) e *O. sativa* (ref. M36191). O retângulo indica a posição em que ocorreu a troca de aminoácidos.

Uma mutação de ponto foi identificada em estudo feito por PARK & SMITH (2006), ocasionando a alteração do aminoácido asparagina por treonina, resultando na resistência de uma população de *S. vulgaris* a herbicidas inibidores do fotossistema II.

Com base nos resultados obtidos, pode-se dizer então que, este SNP não está associado à possível tolerância à ametrina, pois esse acesso não respondeu de forma diferenciada frente à aplicação do herbicida no controle químico das plantas analisadas. Estudos mais detalhados sobre a expressão desse gene devem ser realizados para verificar a influência dessa mutação.

Mesmo não sendo detectado polimorfismo na região crítica de resistência do gene *psbA* entre os acessos estudados, buscou-se também analisar a diversidade genética dentro da espécie em estudo.

4.5. Análise da similaridade genética entre os acessos por RAPD

Inicialmente, ao realizar-se o teste com os oligonucleotídeos iniciadores, 43 foram utilizados para a caracterização dos acessos pela técnica de RAPD. No entanto, somente vinte oligonucleotídeos (ver Tabela 1) foram utilizados para as análises por apresentarem boa amplificação. A repetição da análise foi efetuada para cada iniciador utilizado no cálculo da similaridade genética para confirmação dos resultados.

Os padrões de bandas gerados pelas reações de RAPD foram nítidos. Os vinte iniciadores utilizados permitiram boa amplificação para todas as amostras de todos os acessos, como pode ser observado nas Figuras 14 e 15, cujos fragmentos foram amplificados com os iniciadores de números 249 e 290, respectivamente. O padrão de bandas demonstra a baixa variabilidade genética entre os acessos, ou seja, a maior parte das bandas geradas eram monomórficas. A única exceção foi observada para o acesso 2, no qual, a amplificação com o iniciador 249 gerou uma banda polimórfica de aproximadamente 1000 pb (pares de bases). Para a maioria dos iniciadores utilizados na análise, o acesso 2 apresentou banda polimórfica, a qual poderia inferir em uma possível diferença em relação aos outros acessos.

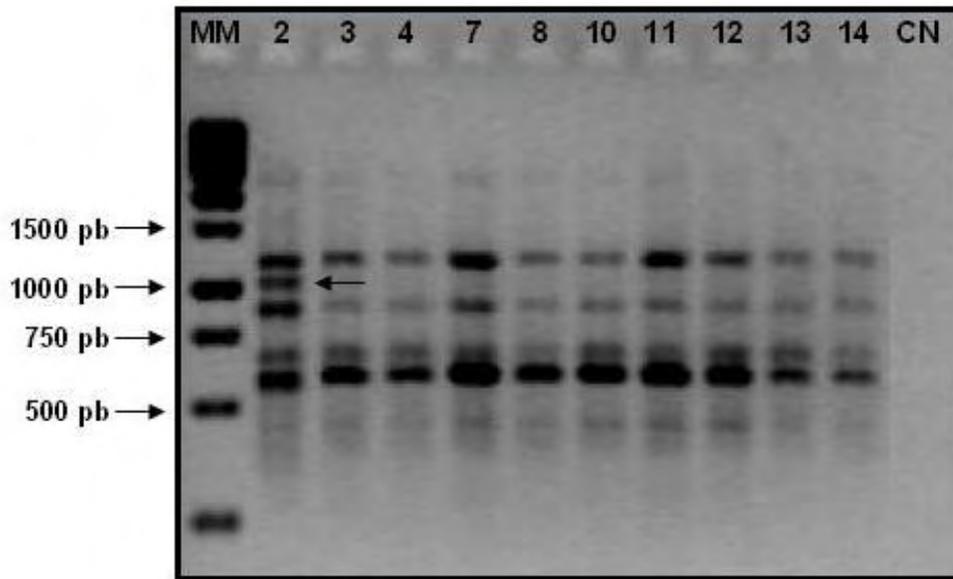


Figura 14. Amplificação dos acessos de *D. nuda* com o iniciador de número 249. A seta indica o polimorfismo gerado para o acesso 2. MM = marcador molecular (“1kb DNA Ladder”); CN = controle negativo. Os números acima das canaletas referem-se aos acessos.

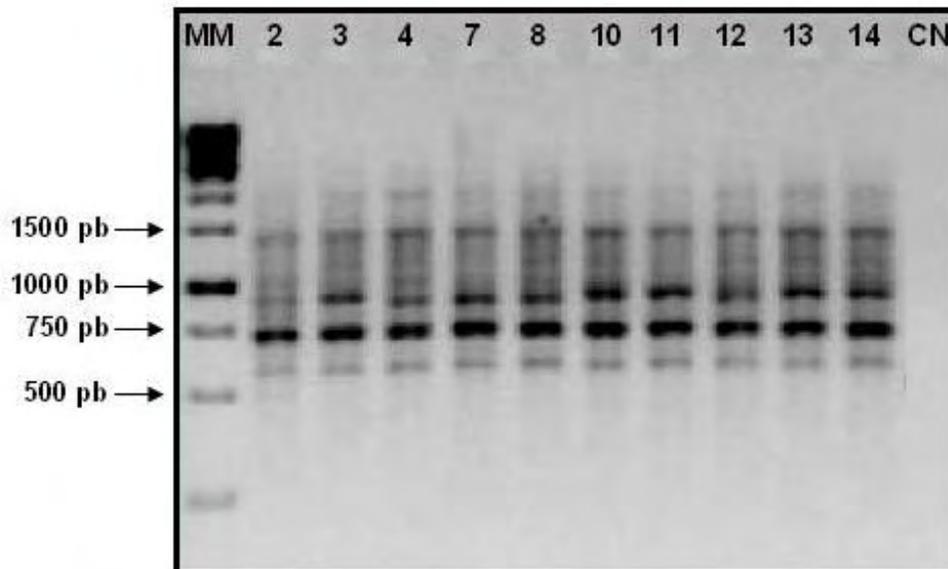


Figura 15. Amplificação dos acessos de *D. nuda* com o iniciador de número 290. MM = marcador molecular (“1kb DNA Ladder”); CN = controle negativo. Os números acima das canaletas referem-se aos acessos.

As bandas geradas foram analisadas e uma matriz binária, com base na presença e ausência da banda, foi construída. Essa matriz foi utilizada para a construção de uma matriz de similaridade a partir do método UPGMA (Tabela 2).

Tabela 2. Matriz de similaridade genética entre os acessos de *D. nuda* obtida pelo método do coeficiente de NEI (1986).

	2	3	4	7	8	10	11	12	13	14
2	1,00									
3	0,90	1,00								
4	0,90	0,99	1,00							
7	0,90	1,00	0,99	1,00						
8	0,90	0,99	1,00	0,99	1,00					
10	0,90	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00				
11	0,90	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00			
12	0,90	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00		
13	0,90	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	
14	0,90	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Observa-se pela matriz que a similaridade do acesso 2 para com os demais acessos foi a menor (90%). Os nove acessos restantes apresentaram similaridade entre 99 e 100%. Portanto, a similaridade média entre todos os acessos foi equivalente a 98%, considerada alta, o que se pode inferir que, dentro das populações de *D. nuda* estudadas, o índice de variabilidade genética foi muito baixo, o que se deve, provavelmente, ao fato da espécie poder ser autógama.

Resultado semelhante foi obtido por CARDOSO et. al (2002, 2005), em acessos de *Eichornia crassipes* (aguapé) e *Pistia stratiotes* (alface d'água), que apresentaram elevada similaridade genética, o que se explica pela forma de propagação vegetativa, que diminui a possibilidade de recombinação genética.

VIDAL et al. (2006) e LAMEGO et al. (2006) ao estudarem acessos de picão-preto com resistência aos herbicidas inibidores da ALS, obtiveram uma similaridade média de 27% e 37% respectivamente, para os acessos avaliados, demonstrando que existe variabilidade genética mesmo dentro de uma mesma população.

Em 2003, CARDOSO et al. ao estudarem a sensibilidade a herbicidas em acessos de aguapé, verificaram que a variabilidade genética existente, aparentemente, não se refletiu em alterações nas plantas que proporcionassem respostas diferenciadas aos herbicidas testados, visto que se obteve 100% de controle. Esse resultado demonstra que a variabilidade não está ligada diretamente à resistência.

A partir dos valores de similaridade genética obteve-se um filograma utilizando-se do UPGMA como metodologia de agrupamento (Figura 16).

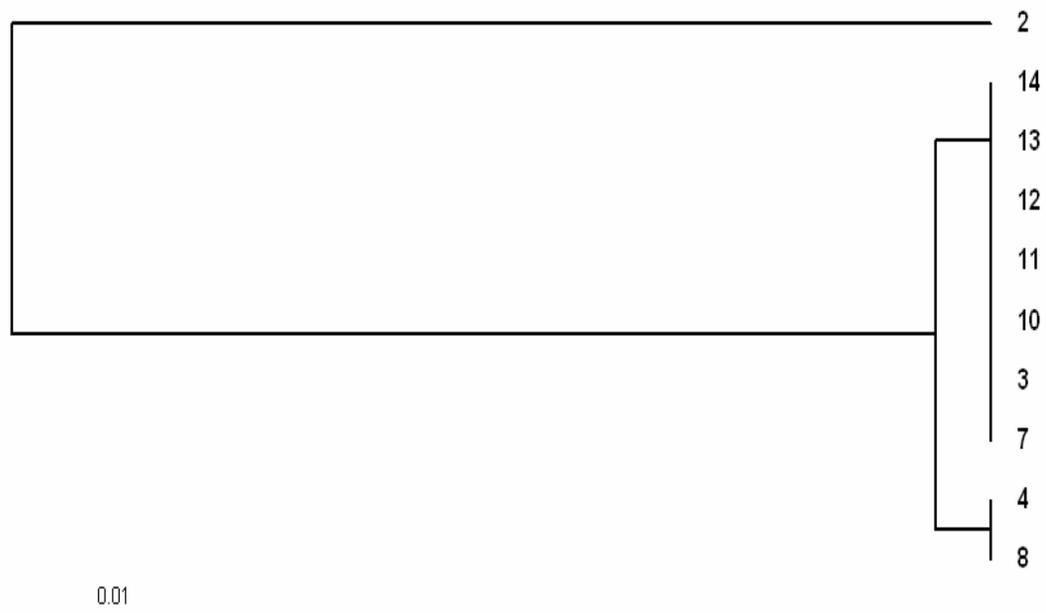


Figura 16. Filograma de similaridade genética entre os acessos de *D. nuda*, obtido pela matriz de similaridade genética. Os números referem-se aos acessos.

Pela análise de agrupamento hierárquico, na Figura 16, observou-se a formação de dois grupos principais. O primeiro grupo distinto, com apenas uma ramificação está representando o acesso 2. O segundo grupo está composto por dois subgrupos, sendo um subgrupo composto pelos acessos 4 e 8, a qual possuem uma similaridade genética de 99% com o segundo subgrupo, composto pelos acessos 3, 7, 10, 11, 12, 13 e 14. Os acessos 4 e 8 não apresentaram uma banda de aproximadamente 700 pb para o iniciador 253, utilizado na análise, os quais ficaram agrupados em um subgrupo distinto.

A análise com o marcador molecular RAPD revelou elevada similaridade genética entre os acessos de *D. nuda* estudados neste ensaio, confirmando assim que todos pertencem à mesma espécie.

Esses marcadores moleculares são importantes para viabilizar a técnica do controle químico, bem como detectar precocemente possíveis indivíduos resistentes dentro de uma população de plantas daninhas frente a diferentes herbicidas, além de estimar a variabilidade genética existente dentro e entre populações, facilitando ou contribuindo para o manejo.

5. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que: o capim-colchão dos dez acessos coletados na região de São Joaquim da Barra, em São Paulo, pertence à espécie *Digitaria nuda* e não foi observada relação entre a ocorrência de perfis polimórficos e a suscetibilidade à ametrina, provavelmente porque todos os acessos estudados foram controlados na dose recomendada do herbicida.

6. REFERÊNCIAS

AGRIANUAL: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: Angra FNP, 2006. 504 p.

BARTELS, P. G. Effects of herbicides on chloroplast and cellular development. In: ___Duke, S. O. (Ed.). **Weed Physiology**, Montana, v. 2, p. 63-90, 1985.

BLANCO, H. G. A importância dos estudos ecológicos nos programas de controle de plantas daninhas. **O Biológico**, São Paulo, v. 38, n. 10, p. 343-350, 1972.

BLEASDALE, J. K. A. Studies on plant competition. In: HARPER, J. L. (Ed.). **The Biology of weeds**, Oxford, p. 133-142, 1960.

CANTO-DOROW, T. S. *Digitaria* Heister ex Haller. In: CANTO-DOROW, T. S.; WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M. (Ed.) **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**, São Paulo: HUCITEC. 2001a. p. 143-150.

CANTO-DOROW, T. S. **O gênero *Digitaria* Haller (Poaceae – Panicoideae – Poniceae) no Brasil**. 2001b. 386 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CANTO-DOROW, T. S. ***Digitarias* do grupo capim-colchão ou milhã ocorrentes no Brasil**. Disponível em: <<http://www.hrac-br.com.br/trabalhos.htm>> Acesso em: 9 mar 2006.

CANTO-DOROW, T. S.; LONGHI-WAGNER, H. M. Novidades taxonômicas em *Digitaria* Haller (Poaceae) e novas citações para o gênero no Brasil. **Insula**, Florianópolis, v. 30, p. 21-34, 2001.

CARDOSO, L. R.; MARTINS, D.; TERRA, M. A. Sensibilidade a herbicidas de acessos de aguapé coletados em reservatórios do Estado de São Paulo. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, Ed. especial, p. 61-67, 2003.

CARDOSO, L. R.; MARTINS, D.; KURAMAR, E. E.; TANAKA, R. H.; MORI, E. S. Variabilidade genética de acessos de aguapé coletados no Estado de São Paulo. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 20, Ed. especial, p. 1-5, 2002.

CARDOSO, L. R.; MARTINS, D.; MORI, E. S.; TERRA, M. A. Variabilidade genética entre populações de *Pistia stratiotes*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n. 2, p. 181-185, 2005.

CARVALHO, J. C. Mecanismo de ação dos herbicidas e sua relação com a resistência a herbicidas. In: CARVALHO, J. C.; CHRISTOFFOLETI, P. J. (Ed.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 2. ed. Campinas: HRAC-BR, 2004. p. 23-48.

CHEUNG, W. Y.; CÔTÉ, J. C.; BENOIT, D. L.; LANDRY, B. S. A rapid assay for chloroplast-encoded triazine resistance in higher plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 11, p. 142–155, 1993.

CHRISTOFFOLETI, P. J. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. In: SIMPÓSIO SOBRE HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS, 1. 1997, Dourados. **Anais...** Dourados: EMBRAPA, 1997. p. 75-94.

CHRISTOFFOLETI, P. J. **Controle de *Brachiaria decumbens* Stapf e de *Cyperus rotundus* (L.) em área de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) através da técnica de rotação com amendoim (*Arachis hypogaea* L.) integrada ao uso de herbicidas**. 1988. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; MEDEIROS, D.; MONQUEIRO, P. A.; PASSINI, T. Plantas daninhas à cultura da soja: controle químico e resistência a herbicidas. In: CÂMARA, G. M. S. (Ed.) **Soja: tecnologia da produção**. Piracicaba: ESALQ, 2000. p. 179-202.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; FILHO, R. V.; DA SILVA, C. B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 13-20, 1994.

DÉLYE, C.; WANG, T. Y.; DARMENCY, H. An isoleucine-leucine substitution in chloroplastic acetyl-CoA carboxylase from green foxtail (*Setaria viridis* L. Beauv.) is responsible for resistance to the cyclohexanedione herbicide sethoxydim. **Planta**, Heidelberg, v. 214, p. 421-427, 2002.

DÉLYE, C.; MENCHARI, Y.; MICHEL, S.; DARMENCY, H. Molecular bases for sensitivity to tubulin-binding herbicides in green foxtail. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, p. 3920-3932, 2004.

DIAS, N. M. P.; REGITANO, J. B.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; TORNISIELO, V. L. Absorção e translocação do herbicida diuron por espécies suscetível e tolerante de capim-colchão (*Digitaria* spp.). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 2, p. 293-300, 2003.

DIAS, N. M. P. **Tolerância de espécies de capim-colchão (*Digitaria* spp.) a herbicidas na cultura de cana-de-açúcar**. 2004. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

DIAS, N. M. P.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; TORNISIELO, V. L. Identificação taxonômica de espécies de capim-colchão infestantes da cultura da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo e eficácia de herbicidas no controle de *Digitaria nuda*. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 3, p. 389-396, 2005a.

DIAS, N. M. P.; PEREIRA, M. R. D. B.; OVEJERO, R. F. L.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; BARELA, J. F.; TORNISIELO, V. L. Population dynamics of *Digitaria* spp. submitted to selection pressure by herbicides in sugarcane crop. **Journal of Environmental Science and Health**, New York, v. 40, p. 21-28. 2005b.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. p. 23-51.

FRAGA, M. I.; TASENDE, M. G. Mechanisms of resistance to simazine in *Sonchus oleraceus*. **Weed Research**, Oxford, v. 43, p. 333-340, 2003.

FREIRE, A. L. O. **Fixação do nitrogênio, crescimento e nutrição mineral de leucena sob condições de salinidade**. 2000. 92 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

FREY, J. E.; MÜLLER-SCHÄRER, H.; FREY, B.; FREI, D. Complex relation between triazine-susceptible phenotype and genotype in the weed *Senecio vulgaris* may be caused by chloroplast DNA polymorphism. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 99, p. 578-586, 1999.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical toll for sequence finishing. **Genome Research**, Toronto, v. 8, p. 195-202, 1998.

GRONWALD, J. W, Resistance to photosystem II inhibiting herbicides. 1994. In: PARK, K. W.; MALLORY-SMITH, C. A. (Ed.). *psbA* mutation (Asn266 to Thr) in *Senecio vulgaris* L. confers resistance to several PS II-inhibiting herbicides. **Pest Management Science**, v. 62, p. 880–885, 2006.

HAMPL, V.; PAVLÍČEK, A.; FLEGR, J. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**, v. 51, p. 731-735, 2001.

HASHEM, A.; DHAMMU, H. S.; POWLES, S. B.; BOWRAN, D. G; PIPER, T. J.; CHEAM, A. H. Triazine resistance in a biotype of wild radish (*Raphanus raphanistrum*) in Australia. **Weed Technology**, Champaign, v. 15, p. 636-641, 2001.

HEAP, I. **International survey of herbicide resistant weeds**.

Disponível em: <<http://www.weedscience.org>> Acesso em: 2 set 2003.

HOLT, J. S.; POWLES, S. B.; HOLTUM, A. M. Mechanisms and agronomic aspects of herbicide resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 44, p. 203-229, 1993.

IEA - **Defensivos Agrícolas**: expectativa de aumento da demanda em 2007. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br/upload/IEA-expectativaaumentodemandadoc>> Acesso em: 26 jul 2007.

KISSMANN, K. G. **Resistência de plantas a herbicidas**. São Paulo: BASF, 1996. p. 33.

KISSMANN, K. G. **Plantas inferiores e monocotiledôneas**. In___Plantas infestantes e nocivas. São Bernardo do Campo: BASF, 1997. T. 1, 824 p.

KUNERT, K. J.; DODGE, A. D. Herbicide-induced radical damage and antioxidative systems. In___BOGER, P.; SANDMANN (Ed.) **Targets sites of herbicide action**. Boca Raton, 1989. p. 45-63.

KUVA, M. A. et al. Períodos de interferências das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar. III - capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) e capim-colonião (*Panicum maximum*). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 1, p. 37-44, 2003.

LAMEGO, F. P.; RESENDE, L. V.; SILVA, P. R.; VIDAL, R. A.; NUNES, A. L. Distância genética e geográfica entre acessos de picão-preto suscetíveis e resistentes a herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 6, p. 963-968, 2006.

LINDER, S. A proposal for the use of standardized methods for chlorophyll determinations in ecological and eco-physiological investigations. **Physiology Plant**, v. 32, p. 154-156, 1974.

LODHI, M. A.; YE, G. N.; WEEDEN, N. F.; REISCH, B. I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis sapequeis*. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 12, n. 1, p. 6-13, 1994.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres e aquáticas**. 3. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2000. 309 p.

MACHADO, V. S. Inheritance and breeding potential to triazine tolerance and resistance in plants. In:___LeBARON, H. M.; GRESSEL, J. (Ed.). **Herbicide resistance in plants**. New York: John Wiley, 1982. p. 257-273.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia vegetal**. Viçosa: UFV, 2005. p. 59-61.

MARTINS, D.; CARDOSO, L. R.; MORI, E. S.; TANAKA, R. H. Caracterização genética de acessos de egéria (*Egeria* spp.) coletados no Estado de São Paulo utilizando RAPD. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, Ed. especial, p. 1-6, 2003.

MATTOS, E. D. **Morfologia de *Cissampelos glaberrima* A. St. Hil. e controle químico**. 2000. 52 f. Monografia (Trabalho de graduação em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

NEI, M. Definition and estimation of fixation indices. **Evolution**, Laurence, v. 40, n. 3, p. 643-645, 1986.

PAGE, R. D. M. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computational Applied Bioscience**, v. 12, p. 357-358, 1996.

PARK, K. W.; SMITH, C. A. M. *psbA* mutation (Asn₂₆₆ to Thr) in *Senecio vulgaris* L. confers resistance to several PS II-inhibiting herbicides. **Pest Management Science**, v. 62, p. 880-885, 2006.

PICCHI, S. C. **Caracterização e análise da diversidade genética na região controladora de imigração de DNA (ICR) de isolados de *Xylella fastidiosa* utilizando RFLP**. 2002. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

PITELLI, R. A. Interferência das plantas daninhas nas culturas agrícolas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 129, p. 16-27, 1985.

PITELLI, R. A. Competição e controle de plantas daninhas em áreas agrícolas. **Série Técnica IPEF**, v. 4, n. 12, p. 1-24, 1987.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**, 5. ed. Londrina: Edição dos autores, 2005. 592 p.

RYAN, G. F. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. **Weed Science**, Champaign, v. 18, p. 614-616, 1970.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SEVERO, J. R. Cana-de-açúcar: setor canavieiro terá super safra em 2003/2004. **Revista Gleba**, Brasília, n. 196, p. 10, 2003.

SIBONY, M.; RUBIN, B. Molecular basis for multiple resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides and atrazine in *Amaranthus blitoides* (prostrate pigweed). **Planta**, Heidelberg, v. 216, p. 1022-1027, 2003.

SILVA, I. A. B. **Determinação do período anterior à interferência (PAI) de plantas de corda-de-viola (*Ipomoea hederifolia*) em cana-soca**. 2006. 53 f. Monografia (Trabalho de graduação em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SINNING, I.; MICHEL, H.; MATHIS, P.; RUTHERFORD, A. W. Characterization of four herbicide-resistant mutants of *Rhodospseudomonas viridis* by genetic analysis, electron paramagnetic resonance, and optical spectroscopy. **Biochemistry**, Washington, v. 28, p. 5544-5553, 1989.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573 p.

STANKIEWICZ, M.; GADAMSKI, G.; GAWRONSKI, S. W. Genetic variation and phylogenetic relationships of triazine-resistant and triazine-susceptible biotypes of *Solanum nigrum* - analysis using RAPD markers. **Weed Research**, Oxford, v. 41, p. 287-300, 2001.

TIAN, X.; DARMENCY, H. Rapid bidirectional allele-specific PCR identification for triazine resistance in higher plants. **Pest Management Science**, v. 62, p. 531-536, 2006.

TREBST, A. The three-dimensional structure of the herbicide binding niche on the reaction center polypeptides of photosystem II. **Zeitschrift fuer Naturforschung**, v. 42c, p. 742-750, 1987.

VIDAL, R. A.; FLECK, N. G.; MEROTTO Jr., A. Período anterior ao dano no rendimento econômico (PADRE): nova abordagem sobre os períodos de interferência entre as plantas daninhas e cultivadas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n. 3, p. 387-396, 2005a.

VIDAL, R. A.; LAMEGO, F. P.; RESENDE, L. V.; Da SILVA, P. R.; DELATORRE, C. A.; TREZZI, M. M. Similaridade genética entre acessos de *Bidens pilosa* resistentes aos herbicidas inibidores da ALS. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n. 3, p. 551-556, 2005b.

VIDAL, R. A.; HERNANDES, G. C.; WINKLER, L. M.; FEDERIZZI, L. C.; Da SILVA, P. R. Relação entre distância geográfica e variabilidade genética de uma população de *Bidens* spp. com resistência aos herbicidas inibidores de ALS. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 1, p. 149-155, 2006.

VIEIRA, V. C. **Variabilidade genética em acessos de trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.) e suas respostas ao glifosato**. 2003. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R. K.; LIVAK, J. L. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxon, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WINKLER, L. M.; VIDAL, R. A.; BARBOSA NETO, 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**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1067-1072, 2003.