

VARIABILIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE TRAPOERABA (*COMMELINA BENGHALENSIS* L.)*

V.C. Vieira*, P.L.C.A. Alves, M.V.F. Lemos, J.A.D. Sena

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, km 5, s/nº, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail: vivicvieira@yahoo.com.br

RESUMO

Com o objetivo de determinar a existência de variabilidade genética em plantas de trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.), foram coletadas plantas em 10 diferentes regiões de quatro Estados do Brasil (SP, MG, MT e MS). Esses acessos foram submetidos a um estudo de variabilidade genética por meio de RAPD com 35 iniciadores arbitrários, os quais geraram 84 bandas polimórficas. Observou-se a formação de 2 grupos principais e o índice de identidade genética entre os acessos estudados apresentou-se acima de 59%. Os acessos de Arceburgo e Taiaçu foram os que apresentaram a maior similaridade genética (95%). Campo Novo do Parecis foi o acesso que mais se distanciou dentro do filograma. Observou-se que a variabilidade genética pela análise de dados dos marcadores RAPD foi pequena entre os acessos de trapoeraba estudados, a qual não se mostrou relacionada à distribuição geográfica, pois nos 2 grupos existem acessos coletados em diferentes Estados.

PALAVRAS-CHAVE: Diversidade, marcador molecular, planta daninha, RAPD.

ABSTRACT

GENETIC VARIABILITY OF TROPICAL SPIDERWORT (*COMMELINA BENGHALENSIS* L.) ACCESSIONS. Aiming to observe the existence of genetic variability in plants of tropical spiderwort (*Commelina benghalensis* L.), plants were collected from 10 different regions of 4 Brazilian states (SP, MG, MT and MS). These accessions were analyzed by RAPD molecular markers using 35 arbitrary primers which revealed 84 polymorphic bands. The establishment of 2 main groups with genetic identity above 59% was observed. The accessions from Arceburgo and Taiaçu were the ones with greater genetic similarity (95%). The accession from Campo Novo do Parecis was the one with less similarity in terms of the phylogram. The genetic variability observed analyzing the RAPD markers was small among the studied tropical spiderwort accessions, with no relation to the geographic region where the accessions were collected, since the two groups formed involve accessions from different states.

KEY WORDS: Diversity, molecular marker, RAPD, weed.

INTRODUÇÃO

A família Commelinaceae apresenta entre 40-50 gêneros, com cerca de 700 espécies. Algumas são cultivadas como ornamentais e por isso são levadas para as mais diversas regiões. As espécies infestantes no Brasil concentram-se em 4 gêneros: *Commelina*, *Tradescantia*, *Tripogandra* e *Murdannia* (KISSMANN, 1997).

Segundo KISSMANN (1997), *C. benghalensis* é uma planta anual reproduzida por semente. Em áreas com suficiente umidade e temperatura há uma perenização

por alastramentos sucessivos. Pedacos de ramos deixados sobre o solo ou enterrados a pequena profundidade permitem o restabelecimento de plantas.

A trapoeraba é bastante freqüente em lavouras anuais, sendo de difícil controle, principalmente, em aplicações isoladas do herbicida glyphosate, podendo acarretar problemas na colheita da cultura da soja (GUIMARÃES *et al.*, 2007). Segundo MONQUERO *et al.* (2004), os mecanismos de tolerância de *C. benghalensis* ao herbicida glyphosate são a absorção e o metabolismo diferencial.

*Parte da dissertação de mestrado da primeira autora. Apoio financeiro: CAPES.

As plantas daninhas são capazes de concorrer pela água, luz, espaço e nutrientes com as culturas de interesse econômico. Uma concorrência que, geralmente, causa redução na produtividade e depreciação qualitativa dos produtos. Estima-se, por exemplo, que as perdas ocasionadas às culturas agrícolas pela interferência das plantas daninhas no Brasil sejam em torno de 20-30%. Assim, para minimizar estes prejuízos, é preciso adotar métodos de controle, tais como: prevenção, controle cultural, biológico, mecânico e químico (SANTOS; ABREU, 2000), ou a integração entre eles.

Um dos objetivos do manejo integrado de plantas daninhas é a prevenção do desenvolvimento de biótipos tolerantes aos herbicidas. MONQUERO *et al.* (2005) constataram que plantas de *C. benghalensis* foram tolerantes à aplicação de glyphosate. Já ROCHA *et al.* (2007), ao estudarem efeito de herbicidas sobre espécies de trapoeraba, verificaram que o tratamento com glyphosate aplicado na forma isolada não foi capaz de inibir completamente o desenvolvimento das plantas de *C. benghalensis*, *C. diffusa* e *C. erecta*.

Devido à crescente relevância dos estudos com as plantas daninhas, a biologia molecular vem tornando-se uma importante ferramenta para o seu conhecimento. Pesquisas sobre a variabilidade genética com o uso de marcadores moleculares, tipo RAPD (DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso), por exemplo, permitem avaliar a origem e dispersão de plantas daninhas. Como exemplos destas pesquisas têm-se os estudos feitos por PEREIRA *et al.* (2000) com *Cyperus rotundus* e de ALVES *et al.* (2003) com *Rottboellia conchinchinensis*. Uma outra aplicação prática do uso de marcadores moleculares é o estudo de variabilidade genética, dispersão e colonização de represas e outros corpos de água por plantas daninhas aquáticas, como os realizados por MORI *et al.* (1999), MARTINS *et al.* (2003) com *Egeria najas* e *E. densa*, e os de CARDOSO *et al.* (2003) e CARDOSO *et al.* (2005) com *Eichhornia crassipes* e *Pistia stratiotes*.

As pesquisas com o uso de marcadores moleculares também servem como ponto de partida para estudos de manejo dessas plantas, porque permitem localizar certos genes relacionados à resistência a herbicidas. TAL; RUBIN (2000), por exemplo, por meio da análise de RAPD, detectaram biótipos de *Phalaris minor* e *Lolium rigidum* resistentes a inibidores da enzima ACCase (acetil Co-A carboxilase). STANKIEWICZ *et al.* (2001), analisando 25 populações de *Solanum nigrum* da Polônia, França e Reino Unido, detectaram 3 grupos de populações no qual a resistência a triazinas surgiu independentemente. Os resultados confirmaram que *S. nigrum*, semelhante a outras espécies predominantemente autógamas, é caracterizada por diferenças genéticas substancialmente maiores entre populações e reduzida variabilidade genética dentro das populações.

Assim sendo, mediante o recente uso dos marcadores moleculares na determinação de biótipos de plantas daninhas visando o manejo adequado dos mesmos, o presente trabalho teve como objetivo determinar a existência de variabilidade genética em plantas de trapoeraba provenientes de diferentes estados do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de trapoeraba, identificadas como *C. benghalensis*, foram coletadas em dez diferentes regiões de quatro estados do Brasil, sendo que cada acesso correspondeu a uma planta (Tabela 1). Essas plantas foram transplantadas em canteiro de 1 m², sob as mesmas condições edafoclimáticas, em área anexa ao Laboratório de Biologia e Manejo de Plantas Daninhas do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP, para a propagação e coleta do material vegetal para a análise molecular.

Folhas jovens (geralmente com a quarta folha totalmente expandida) foram coletadas de cada acesso, identificadas e mantidas em freezer a -80° C até o momento da extração do DNA total. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, seguindo-se a metodologia descrita por DELLAPORTA *et al.* (1983) modificada, com adição do processo de maceração em nitrogênio líquido, para garantir a qualidade do DNA.

Para análise da qualidade do DNA extraído foram feitas corridas em géis de agarose a 0,8%, onde foram aplicados 10 µL de DNA das amostras e 3 µL de tampão de carregamento (Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8), azul de bromofenol 0,02%, glicerol 50%). O tempo de corrida eletroforética foi de, aproximadamente 2h em tensão de 48 V. Os fragmentos de DNA genômico foram visualizados sob luz UV e documentados em fotodocumentador modelo Gel Doc 2000 (Bio Rad).

Tabela 1 - Pontos de coleta das plantas de trapoeraba, que constituíram os acessos a serem estudados, com os respectivos códigos adotados.

| Acessos | Estados | Códigos |
|-----------------------|---------|---------|
| Guaíra | SP | GUA |
| Monte Alto | SP | MAL |
| Taiacú | SP | TAI |
| Arceburgo | MG | ARC |
| Campo Verde | MT | CVE |
| Sorriso | MT | SOR |
| Campo Novo do Parecis | MT | CNO |
| Dourados | MS | DOU |
| Chapadão do Sul | MS | CHA |
| São Gabriel do Oeste | MS | SGA |

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro DU 640B (Beckman), diluídas na proporção de 2 µL da solução estoque de DNA em 98 µL de TE 10:1 (v/v). A concentração final usada como solução de trabalho foi de 10 ng/µL.

Utilizaram-se 59 oligonucleotídeos iniciadores de seqüências arbitrárias de 10 bases, provenientes da coleção da "The University of British Columbia - Nucleic Acid - Protein Service Unit".

As reações de amplificação foram conduzidas em um volume total de 20 mL, contendo: 17 µL de "Mix", constituída de tampão para PCR 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), MgCl₂ (1,25 mM), dNTP (10 mM), Iniciador (5 ng/µL), *Taq* DNA polimerase (2 U), água (grau "Milli-Q") esterilizada (q. s. p.) e 30 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" 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 montado segundo o procedimento: 1 min a 94° C seguido de 36 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a 35° C, 2 min a 72° C e em seguida 72° C por 5 mim.

As amostras amplificadas foram analisadas em gel de agarose a 1,5% utilizando-se do tampão de corrida TBE 1X (Tris 89 mM, H₃BO₃ 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8.2) e 3 mL de tampão de carregamento. O tempo de corrida eletroforética foi de aproximadamente, 2h a uma tensão de 70 V. Os fragmentos amplificados pela PCR e separados por eletroforese foram comparados com o padrão de tamanho molecular conhecido ("1kb Plus 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 com análise de "bootstrap" (indica o percentual de vezes que foi possível a reconstrução dos agrupamentos) pelo "software" FreeTree Win95/98/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) (NEATH; SOKAL, 1973), sendo que o filograma foi obtido com o auxílio do "software" TreeView (PAGE, 1996) incluindo a análise de "bootstrap" (FELSENSTEIN, 1985) de 500 vezes, o qual permite o agrupamento dos acessos, de

forma tanto mais similar quanto mais coincidentes forem os fragmentos de mesmo tamanho molecular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de extração das amostras de DNA utilizado foi eficiente para os referidos acessos. Os padrões de bandas gerados pelas reações de RAPD foram nítidos e produziram bandas de média a boa intensidade. Os iniciadores utilizados permitiram boa amplificação de todas as amostras produzindo bandas polimórficas e demonstraram a existência de variabilidade genética entre as populações, apresentando um índice de similaridade acima de 59%. Dentre os padrões polimórficos obtidos (Fig. 1) estão representadas as bandas provenientes da amplificação com o iniciador de número 229, para as amostras referentes aos acessos de TAI, ARC, CVE, SOR, SGA, CHA, DOU, CNO, GUA e MAL, onde se podem observar regiões polimórficas, verificadas pela presença de bandas em algumas amostras em detrimento a outras.

Inicialmente, ao realizar-se o teste de iniciadores, 59 foram escolhidos para a caracterização dos acessos pela técnica de RAPD. No entanto, somente 35 iniciadores foram utilizados para as análises por apresentarem boa amplificação e presença de bandas polimórficas, sendo produzidas 84 bandas, 16 iniciadores não apresentaram amplificação e 8 iniciadores apresentaram padrões monomórficos.

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

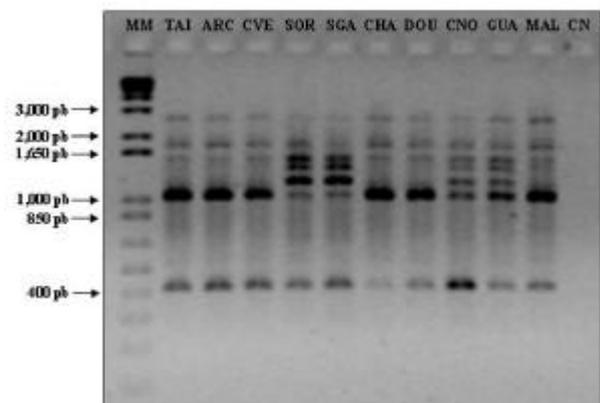


Fig. 1 - Amplificação dos acessos de trapoeraba com o iniciador de número 229. MM = marcador molecular "1kb Plus DNA Ladder"; CN = controle negativo. Os códigos acima das canaletas referem-se aos acessos.

Tabela 2 - Matriz de similaridade genética entre os acessos de trapoeraba obtida pelo método do coeficiente de Nei (1986).

| | ARC | CVE | SOR | SGA | CHA | DOU | CNO | GUA | MAL | TAI |
|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| ARC | 1,00 | | | | | | | | | |
| CVE | 0,88 | 1,00 | | | | | | | | |
| SOR | 0,72 | 0,62 | 1,00 | | | | | | | |
| SGA | 0,63 | 0,60 | 0,83 | 1,00 | | | | | | |
| CHA | 0,90 | 0,81 | 0,64 | 0,59 | 1,00 | | | | | |
| DOU | 0,88 | 0,87 | 0,67 | 0,60 | 0,83 | 1,00 | | | | |
| CNO | 0,77 | 0,72 | 0,73 | 0,70 | 0,74 | 0,75 | 1,00 | | | |
| GUA | 0,84 | 0,78 | 0,73 | 0,69 | 0,80 | 0,78 | 0,78 | 1,00 | | |
| MAL | 0,93 | 0,88 | 0,70 | 0,65 | 0,83 | 0,83 | 0,75 | 0,84 | 1,00 | |
| TAI | 0,95 | 0,83 | 0,71 | 0,61 | 0,90 | 0,87 | 0,78 | 0,81 | 0,88 | 1,00 |

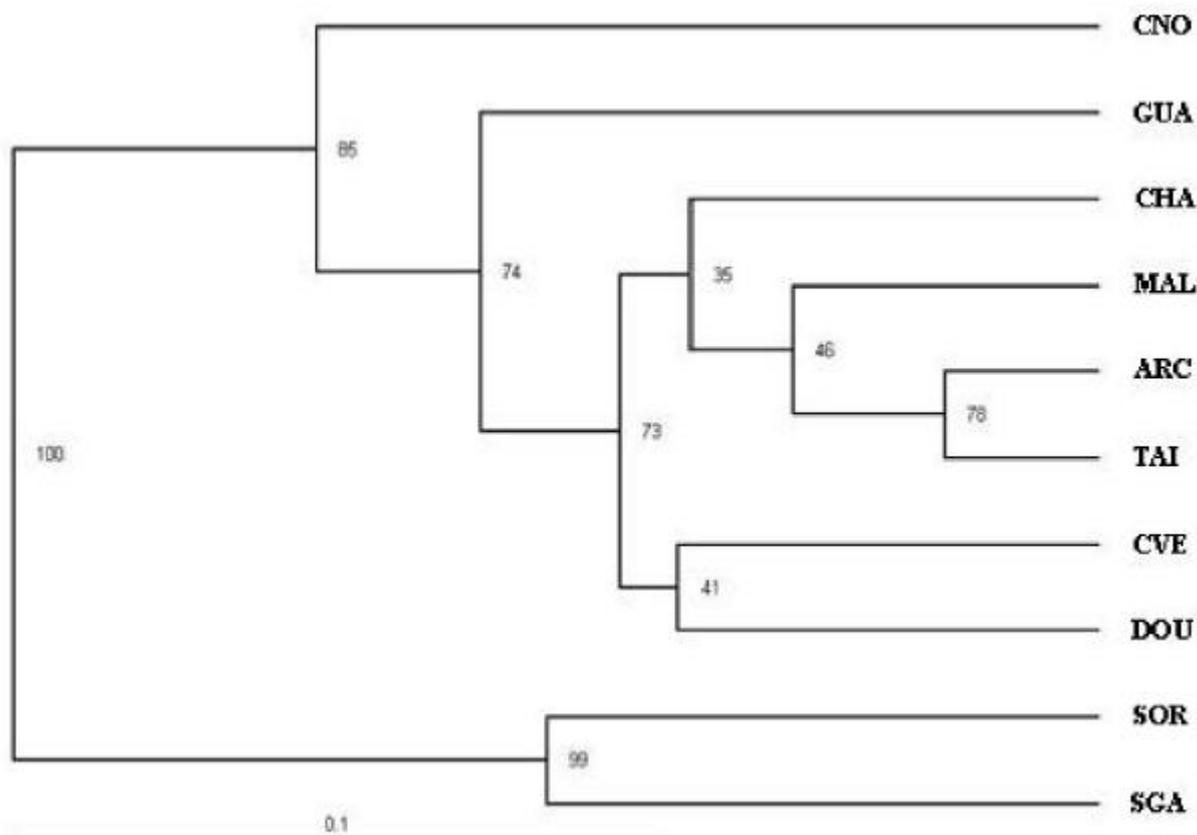


Fig. 2 - Filograma de similaridade genética entre os acessos de trapoeraba, obtido pela matriz de similaridade genética. Os códigos referem-se aos acessos.

A Figura 2 mostra o filograma obtido a partir do agrupamento hierárquico e a análise do valor de "bootstrap" dos principais ramos. O algoritmo "bootstrap" pode revelar a consistência interna dos dados, ou seja, se a topologia mudar com a amostragem dos dados, menor será o valor da proporção do "bootstrap" e, portanto, menor a segurança que se pode ter nela. Na verdade, estudos de simulações mostram que a segurança do "bootstrap" (probabilidade de su-

porte da topologia quando esta é correta) depende do método utilizado na construção de topologia.

Na Figura 2 observa-se a formação de dois grupos principais, dentre estes, um grupo apresentando dois acessos, SOR e SGA, e um grupo maior com os outros 8 acessos estudados. Dentre eles, ARC e TAI foram os acessos que apresentaram a maior similaridade genética (95%). Já CNO foi o acesso que mais se distanciou dentro do filograma.

Resultados com elevada similaridade genética foram obtidos por CARDOSO *et al.* (2003) e CARDOSO *et al.* (2005), em acessos de *E. crassipes* (aguapé) e *P. stratiotes* (alface-d'água), o que se explica pela forma de propagação vegetativa, que diminui a possibilidade de recombinação genética.

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.

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.

A técnica de RAPD é importante para estimar a variabilidade genética existente dentro e entre populações, facilitando ou contribuindo para o manejo dessas plantas.

CONCLUSÕES

Observa-se que houve uma considerável variabilidade genética pela análise de dados dos marcadores RAPD nos acessos de trapoeraba estudados, a qual não se mostrou relacionada à distribuição geográfica, pois nos dois grupos existem acessos coletados de diferentes Estados. No entanto, esta ferramenta molecular sugere que, dentro desta espécie de planta daninha, poderão ocorrer diferenças na suscetibilidade a métodos de controle, dada à variabilidade genética observada entre os acessos estudados.

REFERÊNCIAS

- ALVES, P.L.C.A.; BACHEGA, M.F.; MORO, J.R.; LEMOS, M.V.F.; ALVES, E.C.C.; SILVA, M.A.S.; MORO, F.V. Identification and characterization of different accessions of itchgrass (*Rottboellia cochinchinensis*). *Weed Science*, v.51, n.2, p.177-180, 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*, v.20, p.1-5, 2002. Ed. especial.
- 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*, v.21, p.61-67, 2003. Ed. especial.
- CARDOSO, L.R.; MARTINS, D.; MORI, E.S.; TERRA, M.A. Variabilidade genética entre populações de *Pistia stratiotes*. *Planta Daninha*, v.23, n.2, p.181-185, 2005.
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.1, n.1, p.19-21, 1983.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, v.39, n.4, p.783-791, 1985.
- GUIMARÃES, S.C.; CAVENAGHI, A.L.; CASTRO, R.D.; OLIVEIRA, L.C.; UTIYAMA, S.Y. Controle de plantas daninhas e fitotoxicidade de tratamentos herbicidas em diferentes variedades de soja Roundup Ready. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE, 1., 2007, Botucatu, SP. *Resumos*. Botucatu: 2007. p.214-218.
- HAMPL, V.; PAVLICEK, 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 Evolutionary Microbiology*, v.51, n.3, p.731-735, 2001.
- KISSMANN, K.G. *Plantas infestantes e nocivas*. São Paulo: BASF, 1997. 824p.
- 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*, v.41, n.6, p.963-968, 2006.
- 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*, v.21, p.1-6, 2003. Ed. especial.
- MONQUERO, P.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; OSUNA, M.D.; DE PRADO, R.A. Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. *Planta Daninha*, v.22, n.3, p.445-451, 2004.
- MONQUERO, P.A.; CURY, J.C.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Controle pelo glyphosate e caracterização geral da superfície foliar de *Commelina benghalensis*, *Ipomoea hederifolia*, *Richardia brasiliensis* e *Galinsoga parviflora*. *Planta Daninha*, v.23, n.1, p.123-132, 2005.
- MORI, E.S.; GOUVEA, C.F.; LEITE, S.M.M.; MARINO, C.L.; MARTINS, D.; VELINI, E.D. Caracterização genética de populações de *Egeria najas* presentes no reservatório de Jupiá e rios afluentes. *Planta Daninha*, v.17, n.2, p.217-225, 1999.
- NEI, M. Definition and estimation of fixation indices. *Evolution*, v.40, n.3, p.643-645, 1986.
- PAGE, R.D.M. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, v.12, n.4, p.357-358, 1996.
- PEREIRA, W.; TESSMANN, D.J.; CHARUDATTAN, R. Analysis of genetics variation in *Cyperus rotundus* accessions using molecular markers. In: INTERNATIONAL WEEDSCIENCE CONGRESS, 3., 2000, Foz do Iguaçu, PR. *Resumos*. Foz do Iguaçu: 2000. p.47.
- ROCHA, D.C.; RODELLA, R.A.; MARTINS, D.; MACIEL, C.D.G. Efeito de herbicidas sobre quatro espécies de trapoeraba. *Planta Daninha*, v.25, n.2, p.359-364, 2007.
- SANTOS, P.S.J.; ABREU, A.F.B. *Resistência de plantas daninhas aos herbicidas*. Disponível em: <<http://www.nucleoestudo.ufla.br/gen/permuta/edicoes/2000/semi00s/paulosergio.htm>> Acesso em: 19 jul. 2003.

- SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. San Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573p.
- 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*, v.41, n.4, p.287-300, 2001.
- TAL, A.; RUBIN, B. RAPD markers to identify *Phalaris minor* and *Lolium rigidum* biotypes resistant to ACCase inhibitors. In: INTERNATIONAL WEED SCIENCE CONGRESS, 2000, 3., Foz do Iguaçu, PR. *Resumos*. Foz do Iguaçu: 2000. p.50.
- VIDAL, R.A.; HERNANDES, G.C.; WINKLER, L.M.; FEDERIZZI, L.C.; SILVA, P.R. da Relação entre distância geográfica e variabilidade genética de uma população de *Bidens* spp. com resistência aos herbicidas inibidores de ALS. *Planta Daninha*, v.24, n.1, p.149-155, 2006.
- WINKLER, L.M.; VIDAL, R.A.; BARBOSA NETO, J.F. Caracterização genética de *Euphorbia heterophylla* resistente a herbicidas inibidores da acetolactato sintase. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.38, n.9, p.1067-1072, 2003.

Recebido em 24/8/06

Aceito em 9/11/07