

Biologia molecular aplicada à ciência das plantas daninhas

Molecular biology applied to weed science

Theodoro Schneider^{1*}, Mauro Antônio Rizzardi¹, Anderson Luis Nunes²,
Mario Antonio Bianchi³, Sandra Patussi Brammer^{1,4}, Ana Paula Rockenbach¹

Resumo - As plantas daninhas possuem elevada variabilidade genética, e principalmente por este motivo, são adaptadas a ambientes com intensa atividade humana. Embora o controle de plantas daninhas tenha evoluído de maneira positiva nos últimos anos, elas continuam a interferir na produção agrícola. O objetivo desta revisão bibliográfica é apresentar a contribuição da biologia molecular nos estudos aplicados a herbologia. Há lacunas entre o que aprendemos sobre genômica de plantas daninhas e como esses conhecimentos poderiam nos auxiliar no manejo e melhorar a competitividade de culturas agrícolas frente às plantas daninhas. Muitos estudos na área da ciência das plantas daninhas podem ser realizados com o emprego de técnicas de biologia molecular, sendo eles: caracterização do genoma de espécies de plantas daninhas, visando à identificação destes com maior acurácia, identificação de espécies resistentes a herbicidas e seu mecanismo de resistência, variabilidade e similaridade genética entre populações de plantas daninhas, identificação de genes envolvidos nos processos de interação entre plantas, dentre outros.

Palavras-chave: herbicidas, variabilidade genética, genômica, DNA, biotecnologia

Abstract - The weeds have high genetic variability, mainly for this, they are adapted to environments disturbed by humans. Although weed control has evolved positively in recent years, they continue to interfere with agricultural production. The objective of this bibliographic review is to present the contribution of molecular biology in the studies applied to herbology. There area gap in what we learn about weed genomics, which could help us manage and improve the competitiveness of weed crops. Many studies in the field of weed science can be carried out using molecular biology techniques. The characterization of the genome of weed species, aiming to identify species with higher accuracy, identification of herbicide resistant species and its mechanism of resistance, genetic variability and similarity among weed populations, identification of genes involved in the interaction processes between plants, among other.

Keywords: herbicides, genetic variability, genomic, DNA, biotechnology

Received: January 27, 2017. Accepted: September 08, 2017.

¹ Programa de Pós-graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo – UPF, BR 285, São José, CEP 99052-900, Passo Fundo, RS, Brasil. E-mail: theodoroschneider@hotmail.com; mar.rizzardi@gmail.com; anapagronomia@yahoo.com.br

² Instituto Federal do Rio Grande do Sul – IFRS, Campus Sertão, Sertão, RS, Brasil. E-mail: anderson.nunes@sertao.ifrs.edu.br

³ Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento Rural, Universidade de Cruz Alta – UNICRUZ, Cruz Alta, RS, Brasil. E-mail: mario.bianchi@yahoo.com.br

⁴ Embrapa Trigo, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMPRAPA, Passo Fundo, RS, Brasil. E-mail: sandra.brammer@embrapa.br

Introdução

Nos últimos anos, o mundo está presenciando acentuados avanços na agricultura em geral, avalizados pelas práticas de melhoramento vegetal, modernização nos processos de semeadura e colheita. Ainda, apresenta grande evolução nos conhecimentos básicos de fisiologia vegetal, bioquímica, genômica, genética, cultura de tecidos e biologia molecular. Após o surgimento da engenharia genética, inúmeras áreas da ciência passaram a ser estudados e elucidados com o emprego da biotecnologia. Nas ciências agrônomicas, a aplicabilidade da biotecnologia é fundamental nas diversas áreas como fruticultura, zootecnia, fisiologia, fitotecnia e fitossanidade, visando o melhoramento genético, na descoberta de resistência a doenças, variabilidade genética, expressão gênica e transformação genética (Zanatta e Zanatta, 2012).

De acordo com a expressão do lendário Sun Tzu, “uma das chaves para o sucesso na batalha é conhecer seu inimigo” (Ames, 1993), este fato é igualmente verdadeiro na luta entre os seres humanos e as plantas daninhas. Um conceito fundamental na gestão integrada de pragas é que a mesma deve ser bem compreendida, nos seus pontos fortes e fracos (Norris et al., 2002). Desta forma, a medida que as plantas daninhas tornaram os complexos manejos dificultados, pesquisas são conduzidas para identificar os fatores envolvidos nos processos. Isso porque a principal característica das plantas daninhas é a elevada variabilidade genética (Baker, 1974; Vidal e Merotto Junior, 2001). A diversidade genética existente em uma população é resultado do processo de evolução natural da espécie, que deriva da variação mendeliana, da hibridação interespecífica e da poliploidia (Winkler et al., 2003).

Muitos estudos na área da ciência das plantas daninhas podem ser realizados com o emprego de técnicas de biologia molecular. A caracterização do genoma de espécies de plantas daninhas,

visando à identificação de espécies com maior acurácia, identificação de espécies resistentes e seu mecanismo de resistência, modo de ação de herbicidas, variabilidade e similaridade genética entre populações de plantas daninhas, identificação dos genes envolvidos nos processos de interação entre plantas.

Frente ao exposto, objetivou-se com esta revisão bibliográfica, apresentar a contribuição da biologia molecular nos estudos aplicados a herbologia, relatando as principais técnicas utilizadas.

Marcadores moleculares

Marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente. Os distintos tipos de marcadores moleculares diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade a nível de DNA, e assim variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade (Milach, 1998).

As principais técnicas empregadas com a utilização de marcadores moleculares serão discutidas a seguir. A técnica de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP) é uma ferramenta molecular simples e eficiente que pode ser empregada para 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, através da restrição de fragmentos e hibridização (Picchi, 2002).

Na herbologia, a técnica de RFLP foi empregada com o intuito de identificar variabilidade genética entre populações. Principalmente na identificação de resistência de plantas daninhas aos herbicidas por meio de um diagnóstico molecular na busca de um indivíduo resistente dentro de uma determinada população (Cheung et al., 1993).

A técnica de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (Random Amplified Polymorphic

DNA- RAPD) é baseada na técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR) com duas características distintas. Apresenta uma variação da PCR, pois o oligonucleotídeo único tem sequência arbitrária, portanto sua sequência alvo é desconhecida (Ferreira e Grattapaglia, 1998). É utilizada para a caracterização genética de espécies quando se desconhecem maiores informações genéticas. Outras fontes de polimorfismo incluem 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 e Grattapaglia, 1998). Marcadores deste tipo permitem caracterizar plantas e microrganismos e avaliar a diversidade genética entre indivíduos de uma mesma espécie ou diferentes espécies (Williams et al., 1990).

Em trabalhos envolvendo a caracterização da variabilidade genética com plantas daninhas, a técnica de RAPD oportunizou a análise da variabilidade genética entre populações de *Commelina benghalensis* em comparação a resposta ao herbicida glifosato, revelando elevada variabilidade entre as populações (Vieira, 2003). Ainda, estes marcadores moleculares foram utilizados para verificar relação entre a distância genética e a geográfica em biótipos de *Bidens pilosa* resistentes e suscetíveis aos herbicidas inibidores da enzima aceto lactato sintase - ALS (Lamego et al., 2006). Em plantas daninhas, esta técnica é atrativa em um primeiro momento, pois não se necessita conhecer sobre a sequência nucleotídica da planta, fato comum às plantas daninhas. A técnica RAPD foi eficiente para agrupar diferentes biótipos de *Conyza bonariensis* devido a variabilidade genética, além de que todos os biótipos são mesmo da mesma espécie apresentado variedade distinta (Silva et al., 2016).

Entretanto, as limitações em relação à reprodutibilidade dos resultados e a dificuldade de

explicar a informação biológica dos marcadores RAPD o tornam pouco efetivos no avanço do conhecimento molecular dentro da Ciência das Plantas Daninhas. A técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) é uma técnica na qual fragmentos de DNA, entre 80 e 500 pb, são obtidos a partir da digestão do DNA com enzimas de restrição, normalmente uma de corte raro e uma de corte frequente. AFLP é uma técnica para estudar polimorfismo genético em populações que reúne algumas estratégias empregadas pelas técnicas de RFLP e RAPD, com as vantagens de detectar múltiplos locos por reação e apresentar alta repetibilidade (Jain et al., 1994; Hill et al., 1996).

O polimorfismo gerado por AFLP apresenta herança mendeliana e pode ser usado para estudar similaridade ou dissimilaridade genética dentro e entre populações, para desenvolver marcadores moleculares e para o mapeamento de genes de interesse (Karam et al., 2004). Entre os diferentes tipos de marcadores moleculares, o AFLP apresenta algumas vantagens para uso na caracterização de recursos genéticos, como a detecção de grande número de bandas informativas por reação, com ampla cobertura do genoma e considerável reprodutibilidade e principalmente por não necessitar de dados de sequenciamento prévio da espécie para a construção de *primers* (Spooner et al., 2005; Vuylsteke et al., 2007).

A técnica de AFLP é muito útil para estudar a variabilidade genética e estabelecer relações entre populações de plantas daninhas. Os perfis de banda AFLP resultam de variações nos locais de restrição das enzimas que são utilizadas e da amplificação seletiva dos fragmentos de DNA obtidos (Spooner et al., 2005). Outra vantagem deste tipo de marcador molecular, é que pode ser utilizado em organismos para quais não existe informações genéticas prévia (Bonin et al., 2007; Vuylsteke et al., 2007).

Os marcadores moleculares microssatélites ou *simple sequence repeat* (SSR) são repetições variáveis em *tandem* de uma pequena região de

um a seis pares de nucleotídeos repetidos muitas vezes (Jones et al., 2009). Devido a alta taxa de mutações, essas regiões são de grande interesse na genética de populações. As mutações resultam de marcadores altamente polimórficos e permitem discriminação genética de indivíduos proximamente relacionados, mesmo com o emprego um número relativamente baixo de marcadores microssatélite permite a distinção entre populações (Varshney et al., 2005). Já a presença de múltiplos alelos por *locus* favorece a avaliação da diversidade genética entre populações e subpopulações mesmo em espécies com alto grau de autogamia como a maioria das plantas daninhas (Zhang et al., 2009).

Marcadores SSR apresentam algumas vantagens em suas análises, como: possuir expressão codominante; são hipervariáveis no que diz respeito ao número de alelos por *locus* e, por isso, têm se tornado uma fonte importante de marcadores genéticos polimórficos; são muito frequentes e distribuídos ao acaso ao longo de todo o genoma e a existência de conservação de sítios de microssatélites entre espécies relacionadas torna possível, em alguns casos, a utilização de iniciadores obtidos em uma espécie para outras espécies afins (iniciadores heterólogos). Contudo, há limitações nas análises de microssatélites, como: necessidade do desenvolvimento de iniciadores para cada espécie (ou grupos de espécies relacionadas), o que implica no sequenciamento prévio de partes específicas do DNA e não se conhece o papel funcional das sequências estudadas (Freitas e Bered, 2003). Este tipo de marcador molecular quando utilizados juntamente com a técnica da cauda fluorescente permite de forma simples, rápida e barata a identificação de híbridos daninhos oriundos de fluxo gênico de plantas cultivadas resistentes aos herbicidas para plantas daninhas suscetíveis (Goulart et al., 2011).

Entretanto, com o avanço das técnicas de biologia avançada e genômica funcional tem reduzido a necessidade do uso de marcadores moleculares. Técnicas mais precisas e com maior relação biológica como a expressão

gênica e sequenciamento do DNA colaboram de forma efetiva no entendimento dos processos fisiológicos das plantas. Das quatro técnicas de marcadores moleculares aqui apresentados apenas os microssatélites (SSR) e RFLP ainda possuem uso significativo nas pesquisas relativas a biologia molecular. Com a forte atuação da bioinformática, associada aos seqüenciamentos de inúmeras espécies, permitiu que a cada ano diminua as buscas na rede mundial de computadores sobre os principais marcadores moleculares (Figura 1). A redução dos custos de sequenciamento genético e o maior aporte financeiro para as pesquisas relacionadas à biologia molecular tem limitado o uso de marcadores moleculares somente para as situações em que os mesmos trazem informações rápidas e efetivas.

Tecnologia RNAi no controle de plantas daninhas

Através da biologia molecular, está em estágios iniciais de desenvolvimento a utilização de RNA de interferência (RNAi) no controle de plantas daninhas. A tecnologia de silenciamento de genes é uma das mais recentes novidades proporcionadas pela pesquisa. A tecnologia permite aplicação de produtos específicos e eficazes com ampla gama de aplicações, incluindo controle de plantas daninhas, insetos e vírus. Atua destruindo RNA mensageiros específicos para uma determinada proteína, sendo uma maneira muito efetiva de direcionar a determinados genes e desligá-los (Reddy e Jha, 2016). O uso de RNAi no controle de plantas daninhas envolve a aplicação tópica de uma associação de glifosato com um RNA para interferir na expressão de genes associados a resistência de plantas daninhas a este herbicida. Estudos preliminares demonstram que a tecnologia de RNAi quando combinada com um herbicida, pode reverter a resistência. A tecnologia também foi demonstrada com plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores da ALS, HPPD e Protox (Green, 2014; Shaner e Beckie, 2014).

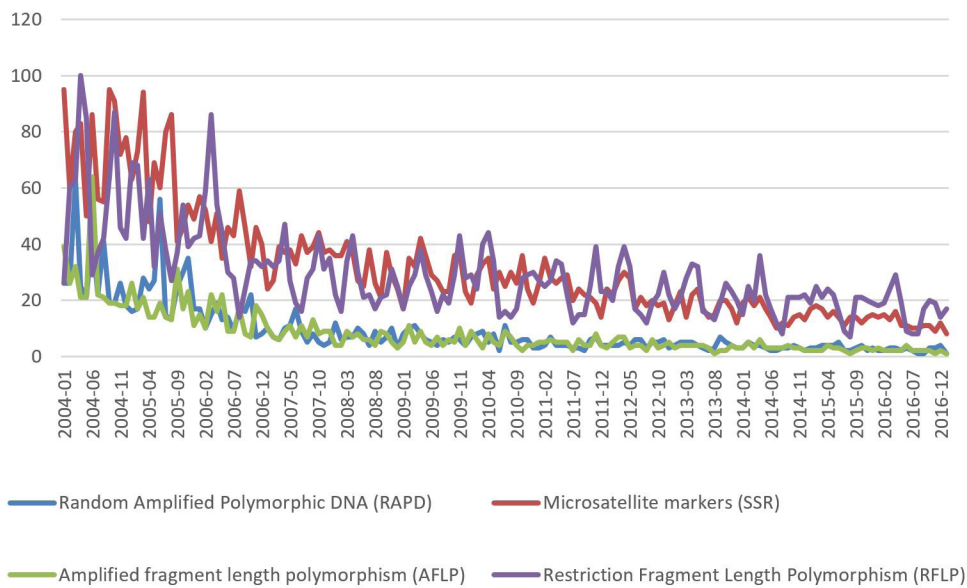


Figura 1. Interesse de pesquisa no mundo sobre as distintas técnicas de marcadores moleculares aplicados em biologia molecular obtido por meio do Google Trends. Os valores no eixo “y” são relativos ao ponto mais alto no gráfico no período de 01/01/2004 a 19/01/2017. O valor de 100 é o pico de popularidade de um termo no período. Um valor de 50 significa que o termo teve metade da popularidade. Da mesma forma, uma pontuação de 0 significa que o termo teve menos de 1% da popularidade que o pico.

RNAi é uma tecnologia revolucionária para manejo de plantas daninhas, principalmente, para aquelas resistentes aos herbicidas. Quando disponível à comercialização seu uso poderá ser realizado da mesma forma como são utilizados os defensivos agrícolas. O produtor adquirirá o RNAi para o controle de plantas daninhas e realizará a aplicação através da pulverização como realizada atualmente. Entretanto, o sucesso comercial desta tecnologia depende ainda da capacidade de formular grandes quantidades de RNAi. Além disso, é necessário manter o RNAi estável para que o produto formulado possa ser estocado.

Sequenciamento de genes

As plantas daninhas sobrevivem à aplicação de herbicidas devido a diversos fatores, os quais podem estar relacionados ou não ao local de ação do herbicida. Quando relacionado ao local de ação, a resistência pode ser decorrente da diminuição

de afinidade do herbicida pelo local de ação na enzima, que resulta de uma mutação na sequência nucleotídica do DNA, ou devido à superexpressão desta enzima (Powles e Yu, 2010).

Desta forma, o sequenciamento de genes relacionados ao local de ação de herbicidas é uma das ferramentas da biologia molecular empregada na ciência das plantas daninhas. O sequenciamento do gene alvo do herbicida pode identificar mutações conhecidas que causam a insensibilidade ao herbicida. Entretanto, esta técnica requer o conhecimento prévio da sequência nucleotídica do gene de interesse da espécie em estudo para a obtenção dos oligonucleotídeos iniciadores que proporcionem a amplificação do gene.

Por meio do sequenciamento do gene ALS em *Sagittaria montevidensis* verificou-se que o mecanismo de resistência aos herbicidas era a insensibilidade dos herbicidas à enzima ALS devido a mutação Pro197Phe (Merotto Junior et al.,

2010). A ferramenta de sequenciamento de sequenciamento de DNA proporciona inúmeras facilidades para a identificação e alterações na composição nucleotídica de genes (Carvalho e Silva, 2010). O DNA da planta em estudo é extraído e posteriormente realizada a etapa de reação da PCR através da utilização de *primers* iniciadores que são sintetizados com a sequência conhecida do gene de interesse. Posteriormente, é realizada a etapa do sequenciamento que é a união de um grande número de sequências de DNA que são unidas para criar uma representação do cromossomo original do DNA em estudo (Ronaghi et al., 1996). A próxima etapa consiste em comparar as sequências de DNA do gene em estudo de um biótipo conhecidamente suscetível com a mesma sequência do biótipo resistente. A partir da alteração em alguma das bases nitrogenadas do biótipo suscetível, é confirmada a resistência devido à alteração no local de ação do herbicida (Powles e Yu, 2010).

Inúmeros trabalhos são relatados confirmando a resistência de plantas daninhas aos herbicidas em função de mutação no gene alvo do herbicida. A resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da aceto lactato sintase (ALS) e da acetil coenzima A carboxilase (ACCCase) são os mecanismos com mais mutações identificadas como o mecanismo de resistência (Powles e Yu, 2010). Ainda, diferentes mutações no gene da EPSPs têm sido relatadas por conferir resistência ao glifosato em inúmeras espécies como: *Eleusine indica*, *Lolium rigidum*, *L. multiflorum*, *Echinochloa colona*, dentre outras (Baerson et al., 2002; Perez- Jones et al., 2005; Kaudum et al., 2011; Alarcón-Reverte et al., 2013).

Atualmente, há uma nova ferramenta da engenharia genética utilizada para o sequenciamento de genes, que é a tecnologia CRISPR/Cas9. Ao comparar bactérias, pesquisadores observaram certo padrão em regiões do DNA: trechos formados por sequências palíndromas espaçadas entre si por sequências únicas, nomeadas de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas ou

(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR). Essas sequências únicas são idênticas ao DNA de vírus que atacam bactérias e funcionam como “etiqueta” para identificar os vírus invasores. As enzimas Cas (proteínas associadas à CRISPR) reconhecem a “etiqueta” e usam essa informação para localizar e clivar o DNA do vírus, impedindo sua ação nas bactérias (Yanagui, 2016).

O sistema CRISP/Cas9 emergiu como ferramenta para criar mutações direcionadas em plantas (Lozano-Justle e Cutler, 2014). Ao co-expressar múltiplos RNAs guia (gRNA) com a enzima Cas9 em plantas, a mutação multiplex eficiente de família de genes pode ser realizada. Ainda, taxas de mutações fora do local alvo em plantas, são baixas ou indetectáveis, no entanto, esta avaliação é em pequena escala (Feng et al., 2014; Nekrasov et al., 2013). Em muitos sistemas não vegetais, o uso de Cas9 na mutagênese alvo é compensado por taxas consideráveis de eventos fora do alvo. Várias abordagens que visam Cas9 ou o gRNA foram criadas por diferentes grupos que levam a taxas reduzidas fora do alvo em sistemas não-vegetais (Ran et al., 2013; Fu et al., 2014).

Apesar desta tecnologia ainda não ser empregada em estudos com plantas daninhas, esta ferramenta é promissora nesta área. Uma vez que a técnica pode ser empregada em inúmeros casos com o objetivo de melhorar a eficiência de culturas competirem com plantas daninhas, tolerância a herbicidas, dentre outras situações.

Expressão gênica

A expressão gênica é o processo pelo qual a informação hereditária contida em um gene, como sequência de DNA, é processada em produto gênico, tal como proteínas ou RNA. Vários passos no processo de expressão gênica poder ser modulados, como a transcrição do RNA mensageiro e a modificação pós-traducional de uma proteína. A regulação gênica controla a estrutura e função dos genes responsáveis por diferenciação celular, morfogênese e para a versatilidade e adaptabilidade

de qualquer organismo. Pode também servir como substrato para mudanças evolutivas, em função da quantidade de expressão dos genes com efeitos nas funções do gene em um organismo.

Como a genômica tem o objetivo de entender como os genes e as informações genéticas estão organizados dentro do genoma, e ainda como essa organização determina a sua função, há o desafio de identificar a função dos genes e entender essas sequências para reduzir a distância existente entre genótipo e fenótipo. Entretanto, um grande número de genes sequenciados possui função desconhecida (Carrer et al., 2010).

A análise da expressão gênica, também chamada de análise de transcriptoma, é uma metodologia significativa para identificar genes candidatos, predição da função de genes e regiões regulatórias (Mochida e Shinozaki, 2010). Várias são as técnicas empregadas na análise da expressão gênica, sendo que o método baseado na hibridização nos microarranjos permite analisar a expressão de dezenas de milhares de genes simultaneamente. Genes identificados com expressão diferencial podem ser clonados e analisados funcionalmente no metabolismo celular e, quando associados com a transgenia também é um dos métodos rotineiramente utilizados (Carrer et al., 2010).

Na área da ciência das plantas daninhas, inúmeros trabalhos são e podem ser realizados para avaliar a expressão de diversos genes. Uma vez que as plantas daninhas competem com as culturas pelos recursos do meio, através da quantificação do nível de expressão de determinados genes, é possível identificar quais são os genes responsáveis ao estresse ocasionado pela competição (Nohato et al., 2016). Assim, o conhecimento da expressão dos genes envolvidos em cada processo pode levar a elaboração de estratégias de melhoramento de plantas visando maior habilidade competitiva frente as plantas daninhas, bem como ao incremento de produtividade nas diversas culturas.

Do mesmo modo, as diversas culturas também possuem potencial para melhorar sua competitividade contra as plantas daninhas. Uma tecnologia ainda

em estágios iniciais de pesquisa é a transformação genética para competir com as plantas daninhas por nutrientes essenciais. Todas as plantas podem utilizar o fosfato (PO_4^{-3}) como fonte de fósforo, mas nenhuma pode utilizar fosfito (PO_3^{-3}). No entanto, alguns microrganismos oxidam o fosfito em fosfato, e as culturas geneticamente modificadas com o gene destes microrganismos podem superar as plantas daninhas em uma situação de fertilização fosfatada a base de fosfito como única fonte de fósforo (Lópes-Arredondo e Herrera-Estrella, 2012). Potencialmente esta técnica permitirá que os produtores manejem plantas daninhas durante a fertilização (Green, 2014).

Ainda, em trabalhos com resistência de plantas daninhas a herbicidas, a expressão de genes pode ser uma alternativa para identificar o mecanismo de resistência envolvido, principalmente pela superexpressão de genes que codificam proteínas alvo de herbicidas ou até mesmo genes que estão envolvidos na metabolização de herbicidas (Délye, 2013; Gaines et al., 2014; Tani et al., 2015).

Aplicação da genômica no manejo de plantas daninhas resistentes

Atualmente vivencia-se o início de uma nova era em que as “ômicas” (genômica, metabolômica, proteômica e transcriptômica) estão inseridas no contexto do manejo de plantas daninhas resistentes a herbicidas. Estas tecnologias permitirão a elaboração de estratégias, como técnicas bioquímica, moleculares e computacionais, que incorporem modelagem de proteínas e cristalografia como formas de prever mutações em plantas daninhas, o que possibilitará a identificação precoce de resistência antes que um herbicida seja comercializado (Hollomon, 2012).

A investigação da resistência de plantas daninhas devido à metabolização do herbicida tem sido dificultada pela ausência de recursos de “ômicas” para a maioria das espécies de plantas daninhas (Délye et al., 2013). Através destas técnicas, a identificação de genes relacionados à resistência metabólica, pelo aumento da acessibilidade da

genômica e transcriptômica, gerará informações de tecnologias para o sequenciamento de gene, uma vez que a análise do perfil de expressão de genes é uma importante ferramenta na identificação dos mecanismos da resistência metabólica (Délye et al., 2013).

Portanto, a melhor compreensão das bases genéticas envolvidas nos mecanismos de resistência é o primeiro passo necessário no desenvolvimento de estratégias de manejo de plantas daninhas resistentes a herbicidas. A aplicação mais ampla destas “ômicas” no manejo da resistência deve seguir, como por exemplo, a melhor compreensão dos mecanismos de resistência, o impacto da rotação de herbicidas e doses dos herbicidas na seleção de plantas daninhas resistentes (Stewart et al., 2009). O sequenciamento rápido e barato de genomas inteiros das espécies de plantas daninhas mais importantes, proporcionará longo avanço na aplicação da ciência das plantas daninhas.

Culturas resistentes a herbicidas

O surgimento da biologia molecular, como uma área específica da biotecnologia representa uma nova estratégia para o manejo de plantas daninhas. As melhores ferramentas de manejo de plantas daninhas estavam entre as primeiras realizações da biotecnologia para a agricultura (James, 1997). Em particular, a soja *Roundup Ready* (RR) deu início a era moderna de manejo de plantas daninhas no ano de 1996, sendo que a resistência a herbicidas destaca-se como a principal característica em culturas geneticamente modificadas comercializadas (James, 2006).

Anteriormente ao advento de culturas transgênicas resistente a herbicidas, a biologia molecular e o melhoramento vegetal tradicional foram usados para desenvolver culturas resistentes a herbicidas não transgênicas. A primeira fonte de resistência originou de uma população de planta daninha da espécie *Brassicacampestris* que foram selecionadas por um herbicida do grupo químico das triazinas. Por meio de retrocruzamento entre a planta daninha e a cultura, conduziu-se a estabilização

do gene de resistência para a cultura (Tranel e Horvath, 2009).

A grande revolução nas culturas geneticamente modificadas com resistência a herbicidas está baseada praticamente em poucos genes. Até o momento o grande impacto de culturas resistentes é devido unicamente ao gene CP4 EPSPS, que codifica a enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintetase resistente ao glifosato. No entanto, o valor do CP4 EPSPS sozinho em culturas com resistência somente ao glifosato está reduzindo com a ocorrência de inúmeras espécies de plantas daninhas com resistência ao glifosato (Green e Castle, 2010; Que et al., 2010).

O sucesso de culturas resistentes a herbicidas é extremamente ligado ao excesso da dependência criada na utilização de apenas um herbicida. Como exemplo, antes da introdução de culturas resistentes ao glifosato, haviam mais de 5 mecanismos de ação de herbicidas utilizados na cultura da soja, e após a introdução da soja RR, somente o glifosato passou a ser utilizado. Isso gerou forte pressão de seleção sobre as populações de plantas daninhas, aumentando os casos de resistência ao glifosato (Powles, 2008).

Ressalta-se que as principais companhias estão trabalhando para desenvolver tecnologias com novas características de resistência a herbicida em combinação com a resistência ao glifosato (Service, 2013). Devido a falta de novos herbicidas com amplo espectro uma das estratégias atuais mais comuns é desenvolver várias culturas com resistência ao glifosato e glufosinato (Tabela 1.) As culturas com múltiplas resistências a herbicidas permitirão maior número de opções com os herbicidas existentes, mas logicamente que não serão a solução total de manejo de plantas daninhas, uma vez que há resistência de plantas daninhas para vários herbicidas utilizados nas transgenias (Duke e Powles, 2008; Green, 2011).

As duas primeiras novas tecnologias de culturas com resistência a herbicidas que terão impacto significativo serão a resistência a herbicida mimetizadores de auxinas, uma com

Tabela 1. Culturas geneticamente modificadas com resistência múltipla a herbicidas. Adaptado de Green, 2014.

Herbicidas	Cultura(s)
Glifosato e glufosinato	Soja, milho e algodão
Glifosato e inibidores da ALS	Soja, milho e canola
Glifosato, glufosinato e 2,4-D	Soja e algodão
Glifosato, glufosinato e dicamba	Soja, milho e algodão
Glifosato, glufosinato e inibidores de HPPD	Soja e algodão
Glifosato, glufosinato, 2,4-D e inibidores da ACCase	Milho
Glufosinato e dicamba	Trigo

resistência ao 2,4-D e a outra com resistência a dicamba, ambas tecnologias para o controle de espécies dicotiledôneas (Behrens et al., 2007). Culturas dicotiledôneas são geralmente sensíveis aos mimetizadores de auxinas, e assim soja e algodão resistentes permitirão o uso destes herbicidas. Apesar do seu uso há mais de 60 anos, relativamente poucas espécies de plantas daninhas desenvolveram resistência a estes herbicidas, principalmente devido a complexidade do local e modo de ação das auxinas (Heap, 2016). Novas formulações menos voláteis e adjuvantes com controle de deriva ajudarão a reduzir o movimento fora do alvo auxiliando no sucesso desta tecnologia (Li et al., 2013).

Para a agricultura é importante a criação de novos herbicidas, de novos mecanismos de ação e de novas culturas com resistência a herbicidas que as plantas daninhas não possuam resistência. No entanto, o posicionamento da indústria é desenvolver culturas com várias resistências a herbicidas (Green, 2009). Há além das culturas RRs, a introdução no mercado de inúmeras alternativas de transgenias e dentre estas, muitas relacionadas com a introdução de genes com capacidade de detoxificar ou metabolizar herbicidas, como a resistência ao 2,4-D, amônio glufosinato, dicamba dentre outros (Brunharo et al., 2014; Queiroz e Vidal, 2014). Em adição, há a formação de culturas resistentes aos herbicidas através de mutagênese, como é o exemplo da cultura do arroz resistente a imidazolinonas, pertencente ao mecanismo de ação dos herbicidas inibidores da enzima ALS.

Considerações finais

A utilização de técnicas de Biologia Molecular tem influenciado positivamente as linhas de estudos e pesquisas básicas na área da herbologia. O emprego de técnicas seja na utilização de marcadores moleculares em estudos de variabilidade genética, caracterização do genoma de espécies daninhas, identificação de espécies, sequenciamento de genes de interesse, criação de culturas geneticamente modificadas, entre outras, possibilita um importante avanço na elucidação e resolução de problemas práticos e básicos da área.

As plantas daninhas possuem rápida evolução na agricultura, e o seu entendimento no nível genômico é de extrema valia, uma vez que através da biotecnologia o descobrimento de respostas que anteriormente limitavam em muitas vezes a eficácia de práticas aplicadas no manejo de plantas daninhas. Através das técnicas apresentadas, as principais espécies de plantas daninhas ocorrentes nas principais culturas agrícolas que apresentam resistência a herbicidas podem ser caracterizadas com o objetivo de reverter o processo de resistência.

A biologia molecular e a genômica abrem novas oportunidades de explorar a fisiologia, a biologia e a genética de plantas daninhas. As informações obtidas nestes campos irá aprofundar a compreensão das interações de plantas daninhas com o ambiente, bem como o desenvolvimento de processos em plantas em geral. O uso dessas informações para desenvolver variedades de cultivo e estratégias culturais que permitam às culturas competir melhor com as plantas daninhas e melhorar as previsões

de alterações ambientais que provavelmente ocasionarão problemas com plantas daninhas, e conduzirá a uma agricultura mais eficiente e sustentável no futuro.

Referências

- Alarcón-Reverte, R.; García, A.; Urzúa, J.; Fischer, A.J. Resistance to glyphosate in junglerice (*Echinochloa colona*) from California. **Weed Science**, v.61, p.48-54, 2013.
- Ames, R.T. **Sun-Tzu: the art of warfare**. New York: Ballantine Books, 1993.
- Baerson, S.R.; Rodriguez, D.J.; Tran, M.; Feng, Y.; Biest, N.A.; Dill, G.M. Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. **Plant Physiology**, v.129, p.1265-1275, 2002.
- Baker, H.G. The evolution of weeds. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.5, p.1-24, 1974.
- Behrens, M.R.; Mutlu, N.; Cjalrabprt, S.; Dumitru, R.; Jiang, W.Z.; Lavalley, B.J. Dicamba resistance: enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies. **Science**, v.316, p.1185-1188, 2007.
- Bonin, A.; Ehrich, D.; Manel, S. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. **Molecular Ecology**, v.16, p.3737-3758, 2007.
- Brunharo, C.A.C.G.; Christoffoleti, P.J.; Nicolai, M. Aspectos do mecanismo de ação do amônio glufosinato: culturas resistentes e resistência de plantas daninhas. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.13, p.163-177, 2014.
- Carrer, H.; Barbosa, A.L.; Ramiro, D.A. Biotecnologia na agricultura. **Estudos avançados**, v.24, p.149-164, 2010.
- Carvalho, M.C.C.G.; Silva, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v.40, p.735-744, 2010.
- Cheung, W.Y.; Côte, J.C.; Benoit, D.L.; Landry, B.S. A rapid assay for chloroplast-encoded triazine resistance in higher plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.11, p.142-155, 1993.
- Délye, C. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. **Pest Management Science**, v.69, p.176-187, 2013.
- Délye, C.; Jasieniuk, M.; Corre, V. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. **Trends in Genetics**, v.29, p.649-658, 2013.
- Duke, S.O.; Powles, S.B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, v.64, p.319-325, 2008.
- Feng, Z.; Mao, Y.; Xu, N.; Zhang, B.; Wei, P.; Yang, D.L. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.111, p.4632-4637, 2014.
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998.
- Freitas, L.B.; Bered, F. (Orgs.). **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. 463p.
- Fu, Y.; Sander, J.D.; Reyon, D.; Cascio, V.M.; Joung, J.K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. **Nature Biotechnology**, v.32, p.279-284, 2014.
- Gaines, T.A.; Lorentz, L.; Figge, A.; Herrmann, J.; Maiwald, F.; Ott, M.C.; et al. RNA-Seq transcriptome analysis to identify genes involved in metabolism-based diclofop resistance in *Lolium rigidum*. **The Plant Journal**, v.78, p.865-876, 2014.
- Goulart, I.C.G.R.; Meroto Junior, A.; Nunes, A.L.; Bered, F. Otimização da utilização de marcadores moleculares microssatélites e sua aplicação em estudos com plantas daninhas. **Planta Daninha**, v.29, p.1175-1181, 2011.

- Green, J.M. Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. **Pest Management Science**, v.70, p.1351-1357, 2014.
- Green, J.M. Outlook on weed management in herbicide-resistant crops: need for diversification. **Outlooks in Pest Management**, v.22, p.100-104, 2011.
- Green, J.M.; Castle, L.A. Transitioning from single to multiple herbicide resistant crops. In: Nandula, V.K. (Ed.). **Glyphosate resistant crops and weeds: history, development and management**. Hoboken: Wiley, 2010. p.67-91.
- Green, J.M. Evolution of glyphosate-resistant crop technology. **Weed Science**, v.57, p.108-117, 2009.
- Heap, I. **International survey of herbicide resistant weeds**. Weed Science, 2016. Disponível em: <www.weedscience.org>. Acesso em: 27 nov. 2016.
- Hill, W.M.; Zabeau, M.; Vos, P. PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.1202-1210, 1996.
- Hollomon, D.W. Do we have the tools to manage resistance in the future? **Pest Management Science**, v.68, p.149-154, 2012.
- Jain, A.; Bhatia, S.; Banga, S.S.; Prakash, S.; Lakshmikumar, M. Potential use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its relationship to heterosis. **Theoretical and Applied Genetics**, v.88, p.116-122, 1994.
- James, C. **Global status of commercialized biotech/GM Crops**. Ithaca: International Service for the Acquisition of agri-biotech applications, 2006. ISAAA Briefs, no.5.
- James, C. **Global status of transgenic crops in 1997**. Ithaca: International Service for the Acquisition of agri-biotech applications, 1997. ISAAA Briefs, no.5.
- Jones, N.; Oughman, H.; Thomas, H.; Pasakinskiene, I. Markers and mapping revisited: finding your gene. **The New Phytologist**, v.183, p.935-966, 2009.
- Karam, D.; Westra, P.; Nessens, S.J.; Ward, S.M.; Figueredo, J.E.F. Genetic diversity among proso millet (*Panicummiliaceum* L.) biotypes assessed by AFLP technique. **Planta Daninha**, v.22, p.167-174, 2004.
- Kaundun, S.S.; Dale, R.P.; Zelaya, I.A.; Dinelli, G.; Marotti, I.; Mcindoe, E.; Cairns, A. A novel P106L mutation in EPSPS and an unknown mechanism(s) act additively to confer resistance to glyphosate in a South African *Lolium rigidum* population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.3227-3233, 2011.
- Lamego, F.P.; Resende, L.V.; Da-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 acetolactatosintase. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.963-968, 2006.
- Li, M.; Tank, H.; Kennedy, A.; Zhang, H.; Downer, B.; Ouse, D. Enlist Duo herbicide: a novel 2,4-D plus glyphosate premix formulation with low potential for off-target movement. **Pesticide Formulations and Delivery Systems**, v.32, p.125-161, 2013.
- López-Arredondo, D.L.; Herrera-Estrella, L. Engineering phosphorus metabolism in plants to produce a dual fertilization and weed control system. **Nature Biotechnology**, v.30, p.889-893, 2012.
- Lozano-Juste, J.; Cutler, S.R. Plant genome engineering in full bloom. **Trends in Plant Science**, v.19, p.284-287, 2014.
- Merotto Junior, A.; Kupas, V.; Nunes, A.L.; Goulart, I.C.G.R. Isolamento do gene ALS e investigação do mecanismo de resistência a herbicidas em *Sagittariamontevicensis*. **Ciência Rural**, v.40, p.2381-2384, 2010.
- Milach, S.C.K. Marcadores de DNA: aplicações no melhoramento de plantas. **Biociência & Desenvolvimento**, v.5, p.14-17, 1998.

- Mochida, K.; Shinozaki, K. Genomics and bioinformatics resources for crop improvement. **Plant & Cell Physiology**, v.51, p.497-523, 2010.
- Nekrasov, V.; Staskawicz, B.; Weigel, D.; Jones, J.D.; Kamoun, S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotianabenthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. **Nature Biotechnology**, v.31, p.691-693, 2013.
- Nohato, M.A.; Benemann, D.P.; Oliveira, C.; Vargas, L.; Avila, L.A.; Agostinetto, D. Expression of genes in cultivated rice and weedy rice in competition. **Australian Journal of Crop Science**, v.10, p.749-757, 2016.
- Norris, R.F.; Caswell-Chen, E.P.; Kogan, M. Concepts in integrated pest management. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2002.
- Perez-Jones, A.; Park, K.W.; Colquhoun, J.; Mallory-Smith, C.; Shaner, D. Identification of glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Oregon. **Weed Science**, v.53, p.775-779, 2005.
- Picchi, S.C. **Caracterização e análise da diversidade genética na região controladora de imigração de DNA (ICR) de isolados de *Xylella fastidiosa* utilizando RFLP**. 52 f. Dissertação – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.
- Powles, S.B. Evolved glyphosate-resistance weeds around the world: Lessons to be learnt. **Pest Management Science**, v.64, p.360-365, 2008.
- Powles, S.B.; Yu, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, v.61, p.317-347, 2010.
- Que, Q.; Chilton, M.D.M.; Fontes, C.M.; He, C.; Nuccio, M.; Zhu, T. Trait stacking in transgenic crops: challenges and opportunities. **GM Crops**, v.1, p.220-229, 2010.
- Queiroz, A.R.S.; Vidal, R.A. O desenvolvimento de culturas tolerantes ao herbicida diclorofenoxiacetato: Revisão de literatura. **Planta Daninha**, v.32, p.649-654, 2014.
- Ran, F.A.; Hsu, P.D.; Lin, C.Y.; Gootenberg, J.S.; Konermann, S.; Trevino, A.E. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. **Cell**, v.154, p.1380-1389, 2013.
- Reddy, K.N.; Jha, P. Herbicide-resistant weeds: Management strategies and upcoming technologies. **Indian Journal of Weed Science**, v.48, p.108-111, 2016.
- Ronaghi, M.; Karamohamed, S.; Pettersson, B.; Uhl m, M.; Nyr m, P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. **Analytical Biochemistry**, v.242, p.84-89, 1996.
- Service, R.F. What happens when weed killers stop killing? **Science**, v.341, n.6152, p.1329, 2013.
- Shaner, D.L.; Beckie, H.J. The future for weed control and technology. **Pest Management Science**, v.70, p.1329-1339, 2014.
- Silva, D.R.O.; Agostinetto, D.; Vargas, L. Molecular characterization of hairy fleabane using RAPD. **Planta Daninha**, v.34, p.433-442, 2016.
- Spooner, D.; Van Treuren, R.; Vicente, M.C. **Molecular markers for genebank management**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2005. 126p.
- Stewart, C.N.; Tranel, P.J.; Horvath, D.P.; Anderson, J.V.; Rieseberg, L.H.; Westwood, J.H. Evolution of weediness and invasiveness: charting the course for weed genomics. **Weed Science**, v.57, p.451-462, 2009.
- Tani, E.; Chachalis, D.; Travlos, I.S. A glyphosate resistance mechanism in *Conyza canadensis* involves synchronization of EPSPs and ABC-transporter Genes. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.33, p.1721-1730, 2015.
- Tranel, P.J.; Horvath, D.P. Molecular biology and genomics: new tools for weed science. **Bioscience**, v.59, p.207-215, 2009.
- Varshney, R.K.; Graner, A.; Sorrells, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, v.23, p.48-55, 2005.

- Vidal, R.A.; Merotto Júnior, A. **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 2001.
- Vieira, V.C. **Variabilidade genética de acessos de trapoerada (*Commelinabenghalensis* L.) e suas respostas ao glifosato**. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.
- Vuylsteke, M.; Peleman, J.D.; Van Eijk, M.J. AFLP technology for DNA fingerprinting. **Nature Protocols**, v.2, p.1387-1398, 2007.
- Williams, J.G.K.; Kubelic, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.D. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.
- Winkler, L.M.; Vidal, R.A.; Barbosa Neto, J.F. Caracterização genética de *Euphorbiaheterophylla* resistente a herbicidas inibidores da acetolactatosintase. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.1067-1072, 2003.
- Yanagui, K. Novas tecnologias, novos desafios. **Ciencia e Cultura**, v.68, p.8-11, 2016.
- Zanatta, T.S.C.; Zanatta, J.F. Aplicações da biotecnologia no estudo de plantas daninhas. **Revista Científica da Faculdade de Balsas**, v.3, p.1-14, 2012.
- Zhang, D.; Zhang, H.; Wang, M.; Sun, J.; Qi, Y.; Wang, F.; et al. Genetic structure and differentiation of *Oryza sativa* L. in China revealed by microsatellites. **Theoretical and Applied Genetics**, v.119, p.1105-1117, 2009.