

Identificação de tolerância ao glifosato e ao glufosinato em linhagens de milho (*zea mays*)

Identification of Glyphosate and Glufosinate Tolerance in Maize (Zea mays) Lines

DANIELA LIBOREDO E SOUZA
Discente de Agronomia (UNIPAM)
liboredodaniela@unipam.edu.br

GUILHERME MATEUS DE ANDRADE
Discente de Agronomia (UNIPAM)
guilhermemateus@unipam.edu.br

WALTER VIEIRA DA CUNHA
Professor orientador (UNIPAM)
walter@unipam.edu.br

Resumo: Este estudo avaliou a eficiência de uma metodologia de extração, amplificação e visualização de DNA por eletroforese. Embora a técnica de amplificação e eletroforese tenha permitido a observação das bandas de DNA, verificou-se que a extração foi inadequada, conforme indicado pelo "arrasto" e pela baixa definição das bandas no gel. Esses resultados sugerem possível degradação do material genético, contaminação das amostras ou adulteração durante o processo. Testes adicionais indicaram que as amostras podem ter sofrido alterações no tamanho dos fragmentos, comprometendo a análise. Conclui-se que, apesar da eficácia da metodologia de visualização, a etapa de extração necessita de otimização, incluindo controles de qualidade mais rigorosos e técnicas complementares para assegurar a integridade do DNA. Recomenda-se a utilização de espectrofotometria ou kits comerciais específicos em estudos futuros para evitar falhas semelhantes e garantir resultados confiáveis.

Palavras-chave: eletroforese; resistência a herbicidas; seleção genotípica.

Abstract: This study evaluated the efficiency of a methodology for DNA extraction, amplification, and visualization via electrophoresis. Although the amplification and electrophoresis techniques enabled the observation of DNA bands, the extraction process was found to be inadequate, as indicated by the "smearing" and poor band resolution on the gel. These results suggest possible degradation of genetic material, sample contamination, or adulteration during the process. Additional tests indicated that the samples may have undergone changes in fragment size, compromising the analysis. It is concluded that, despite the effectiveness of the visualization methodology, the extraction step requires optimization, including stricter quality controls and complementary techniques to ensure DNA integrity. The use of spectrophotometry or specific commercial kits is recommended in future studies to prevent similar failures and ensure reliable results.

Keywords: electrophoresis; herbicide resistance; genotypic selection.

1 INTRODUÇÃO

O milho é um cereal de elevado valor nutritivo, amplamente consumido em todo o mundo. Além disso, destaca-se pela ampla gama de produtos derivados, como o biocombustível, o que reforça a relevância de seu cultivo (Coêlho, 2023). Contudo, os produtores enfrentam desafios significativos relacionados à infestação por plantas daninhas, uma vez que estas competem com o milho por recursos, sobretudo nas fases iniciais do desenvolvimento e em períodos de maior precipitação, provocando perdas econômicas muitas vezes irreversíveis. Objetivando otimizar o controle dessas espécies invasoras, tem-se adotado o manejo químico, especialmente por meio da aplicação de herbicidas não seletivos, como o glifosato e o glufosinato (Sachan *et al.*, 2023).

Entretanto, observou-se que o controle químico pode ocasionar danos à lavoura, especialmente nas estruturas reprodutivas da planta. Nesse contexto, uma das alternativas viáveis para aumentar a produtividade e reduzir custos tem sido o melhoramento genético. Por meio dessa abordagem, tornou-se possível a introdução de genes de tolerância aos herbicidas glifosato e glufosinato no material genético do milho, viabilizando o controle eficiente das plantas daninhas sem comprometer o desenvolvimento da cultura (Albrecht, 2014).

A capacidade do glifosato de inibir a síntese do ácido 5-enolpiruvil-chiquímico-3-fosfato, composto essencial ao metabolismo vegetal, foi descoberta pela empresa Monsanto. Anos mais tarde, foram introduzidas no mercado sementes geneticamente modificadas contendo genes como *AM79 aroA*, *G2-EPSPS*, *gat4621*, *mepsps*, *2mepsps*, *cp4 epsps* e *G10-EPSPS*, os quais conferem resistência ao referido herbicida (Liu *et al.*, 2018). Contudo, o uso intensivo e prolongado dessa molécula ao longo de cinco décadas resultou na seleção de espécies daninhas resistentes à sua ação.

Nesse cenário, o glufosinato passou a ser adotado como alternativa, dada sua atuação na inibição da enzima glutamina sintetase, essencial no processo de assimilação do nitrogênio pelas plantas. Diferentemente do glifosato, que possui ação sistêmica, o glufosinato apresenta ação de contato. A combinação de ambos tem sido empregada como estratégia para diversificar os mecanismos de ação dos herbicidas. Para conferir tolerância ao glufosinato em cultivares comerciais, foram inseridos os genes *pat* (fosfinotricina N-acetiltransferase) e *bar*, os quais atuam bloqueando o sítio de ação do herbicida, impedindo sua atuação e conferindo, assim, resistência às plantas geneticamente modificadas (Brunharo; Christoffoleti; Nicolai, 2014)

Dessa forma, torna-se relevante verificar a presença dos genes *cp4 epsps* e *mepsps*, responsáveis por conferir tolerância ao glifosato, bem como dos genes *bar* e *pat*, que promovem tolerância ao glufosinato, em linhagens de milho (Nandula, 2019). A identificação desses genes visa facilitar a aplicação do controle químico de plantas daninhas no campo, além de possibilitar a previsão do comportamento agrônômico dos híbridos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a presença dos genes *cp4 epsps*, *mepsps*, *pat* e *bar* em linhagens de milho (*Zea mays*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Aferir a presença dos genes *cp4 epsps*, *mepsps*, *pat* e *bar* em dez linhagens de milho por meio do teste PCR convencional.

3 METODOLOGIA

Com o objetivo de verificar e identificar eventos de tolerância ao glifosato e ao glufosinato de amônio em cultivares com as tecnologias PRO2, PRO3, PRO4 e VIP3, realizou-se a extração do DNA genômico a partir de sementes trituradas, utilizando o método de Murray e Thompson (1980), com modificações. Amostras de 100 mg de sementes foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, e submetidas à extração com 800 µL de tampão CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio), seguidos de agitação por 1 minuto e incubação em banho-maria a 65 °C por 15 minutos.

Posteriormente, adicionou-se um volume igual de uma solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:24:1), com homogeneização em vórtex por 1 minuto. A mistura foi centrifugada a 12.000 rpm por 2 minutos para separação das fases. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, repetindo-se o processo de extração com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1).

Após nova centrifugação, a fase aquosa foi novamente transferida e recebeu a adição de 400 µL de etanol a 92%, sendo homogeneizada e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado por inversão. A amostra seca de DNA foi então ressuspensa em 200 µL de tampão TE (Tris-HCl-EDTA, pH 8,0).

Para melhor visualização em eletroforese, as amostras de DNA extraídas foram submetidas à amplificação por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando primers específicos para os genes *cp4 epsps* e *mepsps*, associados à tolerância ao glifosato (EURL GMFF, 2005, 2008, 2010, 2016), e para os genes *pat* e *bar*, relacionados à tolerância ao glufosinato de amônio (Barbau-Piednoir *et al.*, 2011), conforme descrito na Tabela 1.

As reações de PCR foram conduzidas em microtubos de 200 µL, contendo 25 µL de mix para PCR (Sigma-Aldrich), 1 µL de primer *forward*, 1 µL de primer *reverse*, 15 µL de amostra de DNA e 8 µL de água livre de nucleases, totalizando 50 µL por reação. Os ciclos de amplificação em termociclador foram ajustados individualmente conforme as especificações de temperatura e tempo requeridas para cada par de primers utilizados.

Para a leitura do DNA amostral, utilizou-se a técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Foram pipetados 10 µL da amostra de DNA, previamente misturados com 4 µL do corante intercalante SYBR Green I, 4 µL de tampão de carregamento e 2 µL

IDENTIFICAÇÃO DE TOLERÂNCIA AO GLIFOSATO E AO GLUFOSINATO
EM LINHAGENS DE MILHO (ZEA MAYS)

de água ultrapura. O volume total foi então aplicado nos respectivos poços do gel. A corrida eletroforética foi realizada sob tensão constante de 120 V, corrente de 250 mA e potência de 90 W, durante 120 minutos. Após esse período, as bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador, permitindo a avaliação da presença dos genes alvo por comparação com os controles positivos, tanto para o gene da zeína (Barbau-Piednoir *et al.*, 2011) quanto para os genes de interesse.

Tabela 1: Sequenciamento dos principais genes de indução à tolerância ao Glifosato e Glufosinato de Amônio

	Sequência de DNA (5' para 3')	Comprimento (bp)
MON 87427 F	ACG GAA ACG GTC GGG TCA AAT G	95
MON 87427 R	CCA TGT AGA TTT CCC GGT TTT CTC	
MON 88017 F	GAG CAG GAC CTG CAG AAG CT	95
<i>cp4 epsps</i> MON 88017 R	TCC GGA GTT GAC CAT CCA	
NK 603 F	ATG AAT GAC CTC GAG TAA GCT TGT TAA	108
NK 603 R	AAG AGA TAA CAG GAT CCA CTC AAA CAC T	
<i>meps ps</i> GA21 F	CTT ATC GTT ATG CTA TTT GCA ACT TTA GA	112
GA21 R	TGG CTC GCG ATC CTC CT	
<i>pat</i> <i>pat</i> F	CCG CGG TTT GTG ATA TCG TT	109
<i>pat</i> R	TCT TGC AAC CTC TCT AGA TCA TCA A	
<i>bar</i> <i>bar</i> F	CGT CAA CCA CTA CAT CGA GAC AA	69
<i>bar</i> R	GTC CAC TCC TGC GGT TCC T	

	ze F	TGC TTG CAT TGT TCG CTC TCC TAG	
zeína			329
	ze R	GTC GCA GTG ACA TTG TGG CAT	

Fonte: dados da pesquisa, 2024.

RESULTADOS FINAIS

A metodologia adotada demonstrou-se eficiente para a amplificação e posterior visualização do DNA por eletroforese, conforme evidenciado na Figura 1. Contudo, observou-se que a extração de DNA a partir de algumas amostras não foi plenamente satisfatória, o que pode ser verificado pela presença de “arrasto” (*blur*) no gel, indicando possível degradação do material genético ou contaminação por impurezas.

Figura 1: Visualização do DNA ampliado em eletroforese



Fonte: arquivo dos autores, 2024.

Foram realizadas diversas tentativas de adequação da metodologia de extração, contudo, não se obteve êxito na obtenção de DNA de qualidade a partir das amostras fornecidas das linhagens. Os resultados obtidos indicam que, possivelmente, as amostras passaram por algum tipo de tratamento ou interferência, resultando em alterações no tamanho das bandas de DNA e inviabilizando a conclusão do trabalho.

Apesar da eficácia da metodologia para a amplificação e visualização do DNA por eletroforese, a baixa qualidade da extração sugere a presença de contaminantes ou degradação do material genético. O “arrasto” observado nas bandas pode estar relacionado à fragmentação do DNA ou à presença de impurezas, como proteínas, polissacarídeos ou resíduos de solventes, que comprometem a integridade e a pureza do material extraído. Ademais, a ausência de bandas bem definidas pode indicar inadequações nas condições de armazenamento ou manipulação das amostras, resultando em degradação excessiva do DNA (Hasan, 2021).

Outro fator que pode ter contribuído para os resultados insatisfatórios refere-se à possível adulteração das amostras, evidenciada pela inconsistência no tamanho das bandas de DNA observadas na eletroforese. Tal inconsistência pode estar relacionada ao uso de reagentes inadequados ou à variação nos protocolos de extração empregados. Para mitigar falhas semelhantes em experimentos futuros, recomenda-se a

implementação de controles mais rigorosos, como a avaliação prévia da qualidade do DNA antes da etapa de amplificação e a padronização dos procedimentos de extração (Bhoyar; Mehar; Chavali, 2024). Além disso, a confirmação da integridade das amostras por meio de técnicas complementares, como a espectrofotometria, pode ser útil para detectar eventuais contaminações ou adulterações, assegurando maior confiabilidade aos resultados obtidos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de a metodologia de amplificação por PCR e a visualização em gel de agarose terem se mostrado eficientes, os resultados obtidos indicam que a extração do material genético foi comprometida, possivelmente em decorrência de degradação, contaminação ou adulteração das amostras. O padrão de “arrasto” observado no gel e a inconsistência nas bandas amplificadas reforçam a necessidade de otimização dos protocolos de extração, com a inclusão de controles de qualidade mais rigorosos e a verificação prévia da integridade do DNA antes da amplificação. Estudos futuros devem investigar as causas específicas dessas limitações, como a presença de inibidores da PCR, variações nos reagentes ou condições inadequadas de armazenamento. Ademais, a adoção de técnicas complementares, como espectrofotometria ou análise por microfluídica, pode contribuir para a detecção de interferentes e para o aumento da confiabilidade dos resultados. Esses ajustes são fundamentais para assegurar a reprodutibilidade do método e a robustez das conclusões em estudos de genômica aplicada e análises forenses.

REFERÊNCIAS

ALBRECHT, Alfredo Junior Paiola *et al.* O milho RR2 e o glyphosate: uma revisão.

Revista Brasileira de Herbicidas, v. 13, n. 1, p. 58, 10 abr. 2014. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.7824/rbh.v13i1.279>.

BARBAU-PIEDNOIR, Elodie *et al.* Four new SYBR®Green qPCR screening methods for the detection of Roundup Ready®, LibertyLink®, and CryIAb traits in genetically modified products. **European Food Research & Technology**, v. 234, p. 13-23, 2012.

Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-011-1605-7>.

BHOYAR, Lina; MEHAR, Palash; CHAVALI, Krishnadutt. An overview of DNA degradation and its implications in forensic caseworks. **Egyptian Journal of Forensic Sciences**, v. 14, n. 1, p. 15, 2024. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1186/s41935-024-00389-y>.

BRUNHARO, Caio Augusto de Castro Grossi; CHRISTOFFOLETI, Pedro Jacob; NICOLAI, Marcelo. Aspectos do mecanismo de ação do amônio glufosinato: culturas resistentes e resistência de plantas daninhas. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 13, n. 2, p. 163, 10 ago. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.7824/rbh.v13i2.293>.

COÊLHO, Jackson Dantas. **Agropecuária: Milho Produção e Mercados**. Fortaleza: BNB, ano 8, n.291, jul. 2023. (Caderno Setorial Etene). Disponível em: <https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/handle/123456789/1788>.

HASAN, Najat Abdulrazzaq. **Laboratory Manual of Basic Molecular Biology Techniques**. 2021. Disponível em: <https://zenodo.org/records/4541490>

LIU, Miao-Miao *et al.* Molecular characterization and efficacy evaluation of a transgenic corn event for insect resistance and glyphosate tolerance. **Journal of Zhejiang University-Science B**, v. 19, n. 8, p. 610-619, ago. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.b1700345>.

MURRAY, M.; THOMPSON, W.F. Rapid Isolation of High Molecular Weight Plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v.8, p. 535-547. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>.

NANDULA, Vijay K. Herbicide Resistance Traits in Maize and Soybean: current status and future outlook. **Plants**, v. 8, n. 9, p. 337, 9 set. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/plants8090337>.

SACHAN, Dhruvendra Singh *et al.* Effect of Chemical Herbicides on Diversified Weed Flora and Weed Control Efficiency in Maize (*Zea mays* L.). **International Journal of Plant & Soil Science**, v. 35, n. 17, p. 54-61, 1 jul. 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.9734/ijpss/2023/v35i173183>.