

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE EPSPs EM FOLHAS DE CAPIM-AMARGOSO (*Digitaria insularis*) RESISTENTES AO GLIFOSATO

Guilherme Ferreira Sirtoli¹, Gabriel Permanhane da Silva², Ludimilla Laís Motta Nascimento¹, Franciele Barros de Souza Sobreira², Leandro Pin Dalvi¹, Taís Cristina Bastos Soares²

¹Universidade Federal do Espírito Santo/, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Alto Universitário, s/n, Guararema – 29500-000 – Alegre - ES, Brasil, guilhermeferreirasirtoli@gmail.com, mottaludimilla@gmail.com, leandropin@yahoo.com.br

²Universidade Federal do Espírito Santo/ Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Alto Universitário, s/n, Guararema – 29500-000 – Alegre - ES, Brasil, gabriel.silva.94@edu.ufes.br, francielesouza@gmail.com, tcbsoares@gmail.com

Resumo

A cafeicultura é uma atividade agrícola de grande importância socioeconômica no Brasil, destacando-se no uso de mão de obra, fixação no campo e geração de divisas externas. A produção cafeeira enfrenta desafios como a infestação de plantas daninhas, especialmente o capim amargoso, que competem por recursos essenciais e dificultam o manejo. Herbicidas como o glifosato são frequentemente utilizados, mas o uso repetitivo e inadequado pode selecionar biótipos resistentes. O surgimento da biologia molecular representa uma nova estratégia para o manejo de plantas daninhas resistentes, através da possibilidade de investigar, a nível genético, a atuação do glifosato na modificação da expressão gênica. Assim, objetivou-se identificar e coletar capim amargoso com suspeita de resistência ao glifosato em lavouras cafeeiras do sudeste do Espírito Santo e investigar o mecanismo de resistência e susceptibilidade ao herbicida glifosato, através da determinação dos níveis de expressão do gene *EPSPs*. Foi observado que a expressão do *EPSPs* aumentou ao longo do tempo pós aplicação do glifosato. O genótipo resistente apresentou maior expressão do *EPSPs*.

Palavras-chave: Plantas daninhas. Resistência. Herbicida. RT-qPCR.

Área do Conhecimento: Agronomia.

Introdução

A cafeicultura é uma das principais atividades agrícolas com importância socioeconômica no Brasil (OCDE-FAO, 2024), destacando-se no seguimento agropecuário em termos de uso de mão de obra, fixação do homem no campo, assim como em obtenção de divisas externas e arrecadação de impostos (FERRÃO *et al.*, 2008). As espécies de café conilon (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) e arábica (*Coffea arabica* L.) se destacam pela sua grande importância na agricultura nacional, fazendo com que o país ocupe o posto de maior produtor e exportador desse produto. O estado do Espírito Santo ocupa a colocação de segundo maior produtor nacional do café e maior produtor do café conilon. O agronegócio absorve 33% da população economicamente ativa no Espírito Santo e é responsável por 30% do PIB Estadual, sendo a atividade econômica mais importante em 80% dos municípios capixabas (GOVERNO-ES, 2024).

Um dos principais fatores redutores do potencial produtivo das culturas, são as infestações de plantas daninhas, (SILVA *et al.*, 2006), principalmente com o capim-amargoso (*Digitaria insularis* (L.) Fedde), uma planta daninha de difícil controle nas diferentes lavouras no Brasil (LORENZI *et al.*, 2014). Estas plantas têm efeito adverso na produção e no crescimento do cafeeiro através da competição por água, nutrientes e luz (RONCHI *et al.*, 2005). Muitos cafeicultores utilizam herbicidas não-seletivos, como o glifosato, empregados em aplicações dirigidas, afim de tornar o processo de controle das plantas daninhas mais eficiente e econômico (FRANÇA *et al.*, 2010).

Muitas das vezes, por falta de conhecimento do produtor, ocorrem o incremento da dose para alcançar controle adequado das plantas daninhas, desencadeando à seleção de biótipos resistentes pré-existentes, que resultam da pressão de seleção exercida por repetidas aplicações de um mesmo herbicida com mesmo mecanismo de ação, encontrando condições para multiplicação (BETTS *et al.*,

1992). O mecanismo de resistência ao glifosato pode estar relacionado ou não com o local de ação do herbicida (SAMMOS e GAINES, 2014). Mecanismo de resistência relacionado ao local de ação do herbicida pode envolver mutação pontual no gene, como por exemplo, no gene alvo do glifosato, que codifica a expressão da enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPs), ou pode levar à superexpressão do gene EPSPs (GAINES *et al.*, 2010; TANI *et al.*, 2015). O estudo da 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, como o gene EPSPs (SAMMONS e GAINES, 2014; TANI *et al.*, 2015).

Neste contexto, objetivou-se analisar a expressão gênica do gene EPSPs em capim-amargoso, para entendimento a nível molecular e possível esclarecimento dos processos genéticos envolvidos na resistência.

Metodologia

Propágulos de capim-amargo foram coletados em lavouras de café no Espírito Santo e submetidos a testes de resistência ao glifosato, aplicando doses recomendadas pelo fabricante. Após 14 dias de observação, dois genótipos contrastantes foram selecionados para experimentos subsequentes. Em casa de vegetação na Universidade Federal do Espírito Santo – campus de Alegre, foram conduzidos experimentos em triplicata com três tratamentos. Os propágulos foram plantados, irrigados conforme necessário, e o herbicida foi aplicado quando as plantas apresentaram dois perfilhos, utilizando um pulverizador costal a 300 kPa e volume de 120 L ha⁻¹. Os tratamentos incluíram doses de 100% e 200% do recomendado, com coletas de folhas tratadas em 0, 12h e 72h pós-aplicação. As análises moleculares ocorreram no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFES (BqMOL/UFES), utilizando folhas jovens e expandidas armazenadas a -80°C para extração de RNA. O RNA total foi isolado e tratado com DNase, com a concentração determinada via NanoDrop 2000/2000c. O cDNA foi sintetizado usando SuperScript III (Invitrogen®). A quantificação dos níveis de transcrição do gene EPSPs foi realizada por RT-qPCR, utilizando primers específicos para EPSPs e actina (Act, controle endógeno). As sequências de primers utilizados foram: EPSPs: 5'-TGATGGAGCGTTTTGGCGTGA-3' (forward) e 5'-GCATTTTATAGGGGACTTGTA-3' (reverse); Act: 5'-ATATGGCTCACACCATCACC-3' (forward) e 5'-CAGGGAGAAGATGACCCAGAT-3' (reverse). As reações de RT-qPCR foram realizadas com 3 µL de cDNA na diluição de 1:8, e concentração final de 0,4 µM de cada primer, num volume final de 10 µL com 40 SYBR/qPCR MasterMix, GoTaq® (Promega). A amplificação ocorreu em termociclador Roche LightCycler® 96, utilizando o programa: 2 min de desnaturação inicial a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15s e 60 °C durante 1 min. Os dados foram submetidos à ANOVA fatorial tripla em DIC e ao teste de Tukey (5%), com análise pelo pacote ExpDes.pt.

Resultados

Os resultados da ANOVA revelaram um efeito simples significativo tanto dos genótipos ($p < 0,01$) quanto do tempo ($p < 0,01$) sobre os níveis de transcrição de EPSPs. No entanto, não foi observada diferença significativa entre as concentrações de glifosato utilizadas ($p = 0,52$) (Tabela 01).

Tabela 1 - Quadro da Análise de Variância.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Genótipos	1	1,02127	1,02127	24,127	1e-04*
Concentrações	1	0,01776	0,01776	0,4195	0,5233
Tempo	2	0,52496	0,26248	6,2011	0,0067*
Genótipos*concentrações	1	0,06568	0,06568	1,5517	0,2249
Genótipos*tempo	2	0,20770	0,10385	2,4535	0,1073
Concentrações*tempo	2	0,04038	0,02019	0,4769	0,6264
Genótipos*concentrações*tempo	2	0,08883	0,04441	1,0492	0,3657
Resíduo	24	1,01587	0,04233		
Total	35	2,98245			

*Efeito significativo ($p < 0,05$)

Fonte: o autor.

Os desdobramentos da interação revelam a existência de um comportamento diferencial entre os genótipos ao longo do tempo de exposição ao glifosato na concentração de 100%. Neste tratamento, o genótipo 2 (suscetível ao glifosato) manteve os níveis de transcrição de *EPSPs* inalterados ao longo do tempo ($p = 0,74$). Em contraste, o genótipo 3 (tolerante ao glifosato) sofreu efeito significativo do tempo de exposição ($p < 0,01$), exibindo um aumento gradual dos níveis de transcrição até 72h. Além disso, o genótipo 3 apresentou níveis significativamente mais altos de transcrição, em comparação com o genótipo 2, tanto as 12h ($p < 0,01$) quanto as 72h ($p < 0,01$) (Tabela 02, Figura 01 - A). Em contraste, utilizando a concentração de 200% de glifosato, não foi possível observar este mesmo padrão. Ambos os genótipos, 2 ($p = 0,27$) e 3 ($p = 0,32$) mantiveram os níveis de transcrição de *EPSPs* sem alterações significativas ao longo do tempo de observação. No entanto, foram detectados níveis mais altos de expressão no genótipo 3, em comparação com o genótipo 2 ($p = 0,03$), às 12h (Tabela 2, Figura 1 - B).

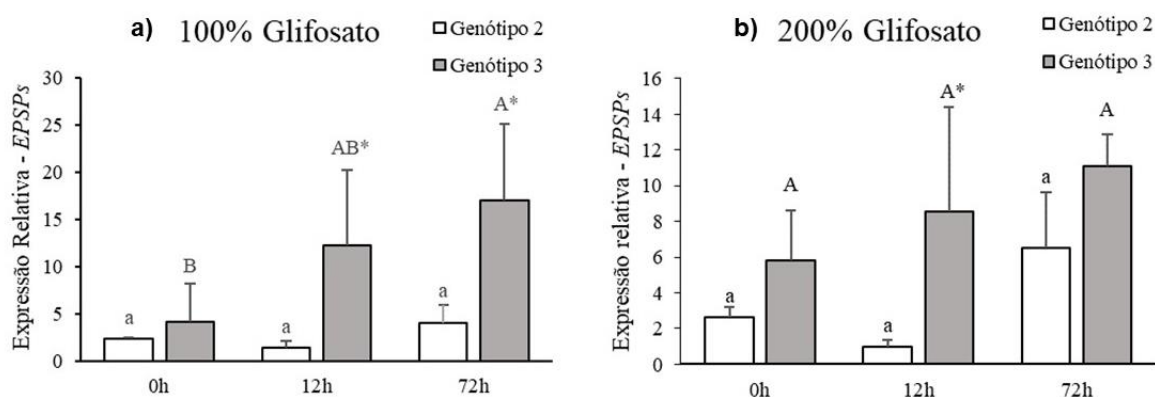
Tabela 2 - Desdobramento do efeito dos genótipos (2 e 3) em ambos os níveis de concentração de glifosato (100% e 200%) e tempo de aplicação (0h, 12h e 72h).

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Genótipos: 100%: 0h	1	0,01157520	0,01157520	0,273464	0,605812
Genótipos: 100%: 12h	1	0,42930827	0,42930827	10,142397	0,003985*
Genótipos: 100%: 72h	1	0,62217458	0,62217458	14,698858	0,000801*
Genótipos: 200%: 0h	1	0,03682900	0,03682900	0,870084	0,360222
Genótipos: 200%: 12h	1	0,20674267	0,20674267	4,884290	0,036886*
Genótipos: 200%: 72h	1	0,07685213	0,07685213	1,815630	0,190419
Resíduo	24	1,01587415	0,04232809		

*Efeito significativo ($p < 0,05$)

Fonte: o autor.

Figura 1 - Expressão Relativa de *EPSPs* em genótipos de Capim-Amargo contrastantes para a tolerância ao glifosato, em função do tempo de aplicação, nas concentrações de 100% (a) e 200% (b).



Os valores representam a média (+DP) calculada a partir de três repetições biológicas. Médias representadas pela mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, 5%) (minúsculas para Gen. 2, maiúsculas para Gen. 3).

Asteriscos (*) indicam diferença significativa entre os genótipos no mesmo tratamento.

Fonte: o autor.

Discussão

O glifosato destaca-se como uma das moléculas mais eficazes para o controle seletivo de plantas daninhas, atuando em diversos estágios de desenvolvimento (MANEIRA, 2017). Seu mecanismo de ação envolve a inibição da enzima 5-enolpiruvato-chiquimato-3-fosfato sintase (*EPSPs*) na via metabólica do ácido chiquímico. Ao ligar-se ao complexo *EPSPs*, o glifosato forma um complexo inativo, impedindo a interação com o fosfoenolpiruvato (PEP), o que obstrui a rota do ácido chiquímico e compromete a produção de fenilalanina, tirosina e triptofano, aminoácidos de cadeia aromática essenciais ao desenvolvimento das plantas (GOMES *et al.*, 2014; CORRÊA *et al.*, 2016).

Neste experimento, observou-se que o genótipo 2 (suscetível ao glifosato) manteve os níveis de transcrição de *EPSPs* inalterados ao longo do tempo. Em contraste, o genótipo 3 (tolerante ao glifosato) sofreu um efeito significativo do tempo de exposição, exibindo um aumento gradual dos níveis de transcrição até 72 horas. Na via do ácido chiquímico, o chiquimato é primeiro convertido em chiquimato 3-fosfato, um substrato para a enzima *EPSPs*, por ação da chiquimato quinase. Em seguida, a *EPSPs* catalisa a conversão do chiquimato 3-fosfato em 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato (TZIN e GALILI, 2010; MAEDA e DUDAREVA, 2012). Esses resultados sugerem que, após o tratamento com glifosato, não apenas a expressão de *EPSPs*, mas também a síntese do substrato chiquimato 3-fosfato foram elevadas como resposta da planta ao herbicida, conforme encontrado por Zhang *et al.* (2021).

Conclusão

Em conjunto, estes resultados sugerem uma participação relevante da expressão de *EPSPs* na promoção da tolerância ao glifosato em genótipos contrastantes de capim-amargo. O genótipo 3 (tolerante ao glifosato) demonstrou maior responsividade à aplicação do herbicida, induzindo a transcrição de *EPSPs*. No entanto, este padrão foi observado apenas quando aplicada a concentração de 100% de glifosato. Quando exposto a uma concentração de 200%, o genótipo 3 não foi capaz de responder de forma efetiva ao herbicida, apesar de apresentar níveis de transcrição mais altos que o genótipo 2 às 12 horas de tratamento. Assim, concentrações muito elevadas de glifosato podem inviabilizar este possível mecanismo de tolerância.

Referências

BETTS, K. J.; Ehlke, N. J.; Wyse, D. L.; Gronwald, J. W.; SOMERS, D. A. Mechanism of inheritance of diclofop resistance in italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). **Weed Science**, v. 40, n. 2, p. 184-189, 1992.

FERRÃO, R. G.; Fornazier, M. J.; Ferrão, M. A. G.; Prezotti, L.C.; Fonseca, A. F. A. Da; Alixandre, F. T.; Ferrão, L.F.V. Estado Da Arte Da Cafeicultura No Espírito Santo. In: Tomaz, M. A.; Amaral, J. F. T. Do; Jesus Junior, W. C. De; Pezzopane, J. R. M. **Seminário para a sustentabilidade da cafeicultura**. Alegre: UFES/CCA, 2008. p. 29-48.

FRANÇA, A. C. *et al.* Crescimento de cultivares de café arábica submetidos a doses do glyphosate. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 599-607, 2010.

GAINES, T. A.; Preston, C.; Leach, J. E.; Chisholm, S. T.; Shaner, D. L. Gene amplification is a mechanism for glyphosate resistance evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 3, p. 1029-1034, 2010.

GOVERNO, ES. Disponível em: <<https://www.es.gov.br/agronegocio>> Acesso em: ago. 2024.

LORENZI, H *et al.* Manual de Identificação e Controle de Plantas Daninhas. 7ª Edição. Nova Odessa, SP: **Instituto Plantarum**. 2014.

MAEDA H, Dudareva N. 2012. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Biology**, 63, 73–105.

OCDE-FAO- Organization For Economic Cooperation And Development And Food And Agriculture Organization Of The United Nations. **Agricultural Outlook 2018-2027**. Disponível em: <<http://www.agri-outlook.org/>>. Acesso em: ago. 2024.

RONCHI, C. P.; Silva, A. A.; Terra, A. A.; Miranda, G. V.; Ferreira, L. R. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid applied as a herbicide on fruit shedding and coffee yield. **Weed Research**, v. 45, p. 41 – 47, 2005.

SAMMONS, R. D.; Gaines, T. A. Glyphosate resistance: State of knowledge. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1367-1377, 2014.

SILVA, S. O.; Matsumoto, S. N.; Bebé, F. V.; São José, A. R. Diversidade e frequência de plantas daninhas em associações entre cafeeiros e grevéleas. **Coffee Science**, v.1, p. 126-134. 2006.

TANI, E.; Chachalis, D.; Travlos, I. S. A glyphosate resistance mechanism in *Conyza canadensis* involves synchronization of EPSPS and ABC-transporters. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 33, n. 6, p. 1721-1730, 2015.

TZIN V, Galili G. 2010. New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. **Molecular Plant**, 3, 956–972.

ZHANG, Chun *et al.* Transcriptomic analysis reveals the transcription factors involved in regulating the expression of EPSPS gene, which confers glyphosate resistance of goosegrass (*Eleusine indica*). **Journal of Integrative Agriculture**, v. 20, n. 8, p. 2180-2194, 2021.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pelas bolsas e suporte financeiro. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade em pesquisa da coordenadora deste estudo. À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) por possibilitar a realização dessa pesquisa.