

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/10905
IB/80176

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1989

Este exemplar corresponde a redação final da
tese defendida pela candidata Rosely Tiemi Sakata
e aprovada pela comissão julgadora.



EFEITO DO HERBICIDA GLIFOSATO EM CULTURA DE TECIDOS
DE MILHO (*Zea mays* L.).

Rosely Tiemi Sakata

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título
de Mestre em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Arruda

SM

CAMPINAS

Estado de São Paulo - Brasil

1989



ASIF	1
FOR	5a29e
MEMO BY	10905
	1895

13/ 80176

134 10905

Aos meus pais
Seiji e Kimie,

dedico

À amiga Luciane

ofereço

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Paulo Arruda pela orientação.
- À DNA Plant Technology Corporation, pelo treinamento oferecido, auxiliando no desenvolvimento deste trabalho, em especial ao Dr. Marco R. Sondahl, pela amizade confiança e preciosas sugestões.
- Ao Laboratório de Bioquímica da Monsanto (St. Louis, MO, USA) pelos experimentos realizados com HPLC e pelas drogas fornecidas para a realização de outros experimentos.
- À Monsanto (São Paulo), em especial ao Dr. Carlos Fernandez pela atenção e fornecimento do herbicida Roundup.
- Ao Prof. Dr. William José da Silva pelas críticas e sugestões, que foram fundamentais para minha formação científica e desenvolvimento deste trabalho, e pela amizade e confiança.
- Ao Prof. Dr. Alberto José Prioli e Profa. Dra. Laudemir M. Prioli, pela amizade, estímulo e pelas discussões e sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho.
- Ao Professores Dr. Aquiles Piedrabuena, Dr. Renato Bonatelli Junior e Dr. Antonio Celso N. Magalhães, que realizaram o exame prévio desta tese, pelas importantes críticas e sugestões apresentadas.

- Ao Olivete Bonfim, Elisabeth R. Bilo e Sílvia H. C. Crivelenti pelo auxílio técnico
- À Laura M. M. Ottoboni, Márcia R.B. Braga e Sílvia M. Ottoboni, pelas valiosas colaborações.
- À Alejandra, Cristina, Jaqueline e Nancy pela amizade e estímulo.
- Aos amigos Sr. Bento, Da. Cida e Da. Geraldina por toda "força", indispensáveis durante estes anos.
- Aos amigos Edson e Ione por todo auxílio na digitação e montagem desta tese.
- À Ana, Suely e Thaís pela "torcida".
- À Branquinha, Cristiane e Janie pela "força".
- Ao Jackson pela "presença" e "companheirismo".
- À minha Família por todo apoio e carinho sempre presente.

Este trabalho teve suporte financeiro de bolsas concedidas pela CAPES CNPQ e Monitoria-UNICAMP.

ABREVIATURAS

AEC = 5-2-aminoetil-L-cisteína

6-BA = 6- benzilaminopurina

BAM = Benzamidina

BSA = Soro albumina bovina

C = Carbono 14

CIN = Cinetina

2,4-D = Ácido 2,4-diclorofenoxiácético

DNA = Ácido desoxirribonucléico

DTT = Ditionitrosol

EDTA = Ácido etilenodiamina tetracético

EPSP = 5-enolpiruvil shiquimato 3-fosfato

EPSPs = 5-enolpiruvil shiquimato 3-fosfato sintetase

HEPES = Ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N -2-etanosulfônico

HPLC = Cromatografia líquida de alta resolução

LT = Lisina + treonina

MB-1 = Meio de cultura básico

MR = Meio de cultura para regeneração

SMT = 5 metil-DL-triptofano

PEP = Fosfoenol piruvato

Pi = Fósforo inorgânico

POPOP = 1,4-bis[2-(5-feniloxazólico)]-benzeno

PPO = 2,5-difeniloxazólico

S3P = Shiquimato 3-fosfato

SDS = Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE = Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

TEMED = N,N,N ,N -tetrametiletlenodiamina

I N D I C E

Página

1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	5
2.1. Tolerância de plantas a herbicidas	8
2.1.1. Utilização da cultura de tecidos para seleção de mutantes	11
2.2. Seleção de mutantes tolerantes a herbicidas	13
2.2.1. Herbicida glifosato	19
3. Material e Métodos	26
3.1. Material vegetal	26
3.2. Cultura de tecidos	26
3.2.1. Calos embriogênicos friáveis	26
3.2.2. Manutenção de calos	27
3.3. Tolerância de calos embriogênicos ao herbicida glifosato	27
3.3.1. Determinação da concentração subletal do herbicida glifosato para calos embriogê- nicos friáveis	27
3.3.2. Seleção de calos embriogênicos friáveis tolerantes ao herbicida glifosato	31
3.3.3. Efeito do glifosato puro	32
3.4. Tolerância de plântulas ao herbicida glifosato	32
3.5. Absorção de glifosato ¹⁴ C em calos embriogênicos	34
3.6. Determinação da atividade da enzima EPSPs	35
3.6.1. Determinação da atividade específica através da liberação de Pi	35
3.6.1.1. Preparo e purificação do extrato bruto de calos	36
3.6.1.2. Ensaio da EPSPs	37

3.6.1.3. Determinação de Pi liberado	37
3.6.1.4. Dosagem de proteína total do extrato bruto de calos	38
3.6.2. Determinação da atividade específica da enzima EPSPs pelo método de HPLC	38
3.7. Eletroforese de proteínas em gel de poliacri- lamida	40
3.7.1. Preparo das amostras	40
3.7.2. Preparo dos géis de SDS-poliacrilamida	40
3.7.3. Aplicação da amostra e eletroforese	41
3.8. Regeneração de plantas	42
3.8.1. Teste de regeneração para a linhagem TuxMo-1 ...	43
4. Resultados e Discussão	46
4.1. Determinação da concentração subletal do glifosato em calos embriogênicos friáveis de milho	46
4.2. Seleção de calos embriogênicos friáveis ao glifosato comercial	49
4.3. Efeito do glifosato puro	59
4.4. Tolerância de plântulas ao herbicida glifosato	62
4.5. Absorção de glifosato ¹⁴ C em calos embriogênicos friáveis	69
4.6. Determinação da atividade da enzima EPSPs	73
4.7. Eletroforese de proteína total	78
5. Conclusão	83
6. Resumo / Summary	85
7. Referências Bibliográficas	93

EFEITO DO HERBICIDA GLIFOSATO EM CULTURA DE TECIDOS DE MILHO (*Zea mays* L.)

1. INTRODUÇÃO

A utilização de herbicidas químicos consiste em um dos mais eficientes meios de controle de ervas daninhas na agricultura. Extensos programas de pesquisa têm sido dirigidos no sentido de desenvolver compostos com amplo espectro de ação, seletivos e de baixa toxicidade ao homem e aos animais.

Para muitas culturas ainda não existe um herbicida apropriado e a escolha de um herbicida seletivo adequado a uma determinada cultura depende muito das diferenças entre a planta cultivada e as espécies daninhas. O uso de uma dada concentração adequada para eliminar as espécies daninhas não deve ser prejudicial à cultura. Outros fatores que também devem ser levados em consideração são o modo de ação e a forma pela qual é metabolizado pelas plantas. Alguns herbicidas inibem vias biossintéticas relacionadas com a atividade fotossintética enquanto que outros inibem a biossíntese de aminoácidos.

Entretanto a pressão de seleção do herbicida resulta no desenvolvimento de ervas daninhas tolerantes e também em alterações nessas populações. Duas alternativas têm sido utilizadas para solucionar este problema. A primeira é o desenvolvimento de um herbicida novo mais seletivo ou de uma nova formulação para um herbicida já existente. Esse processo, entretanto, é prolongado e

caro pois o desenvolvimento de um produto novo requer testes sofisticados de milhares de compostos. A segunda alternativa é a seleção de plantas tolerantes a um determinado produto químico, que possa ser utilizado como herbicida não seletivo.

O desenvolvimento de um novo genótipo tolerante a um herbicida pode ser relativamente simples, envolvendo uma única mutação gênica. Em outros casos, análises genéticas têm demonstrado que a tolerância pode ser devido a um maior número de genes. Entretanto, em muitas espécies cultivadas, a seleção de plantas tolerantes através de técnicas convencionais de melhoramento é tarefa extremamente difícil devido à complexidade das interações genótipo-ambiente-herbicida. Portanto torna-se necessário o estudo de metodologias alternativas que possibilitem o desenvolvimento de genótipos tolerantes. Por outro lado, os progressos recentes nas áreas de biologia celular e molecular trazem novas alternativas para o desenvolvimento de uma metodologia adequada para a ampliação de conhecimentos dos mecanismos genéticos-bioquímicos envolvidos na tolerância a herbicidas, assim como para a seleção de plantas tolerantes aos herbicidas já existentes.

A utilização de técnicas de cultura de tecidos e células permite uma melhor identificação e seleção de variantes genéticas e representa uma enorme simplificação para o sistema de seleção de genótipos tolerantes a herbicidas. Além disso, estas técnicas possibilitam o estudo de passos metabólicos específicos envolvidos na resposta de tolerância e a caracterização do modo de ação do herbicida sob condições experimentais controladas e definidas. Portanto, é importante avaliar a possibilidade da utilização da

técnica de cultura de tecidos nos estudos que envolvem mecanismos genéticos-bioquímicos.

O desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos vegetais teve um grande progresso nos últimos 10-15 anos. Um grande impulso foi dado para o desenvolvimento da metodologia de cultura de tecidos de gramíneas, inclusive o milho, que até 5-6 anos atrás eram consideradas espécies recalcitrantes para a regeneração de plantas "in vitro". O milho é o terceiro mais importante cereal do mundo e uma das espécies vegetais com maior acúmulo de conhecimentos básicos. A possibilidade de se utilizar técnicas de seleção de mutantes bioquímicos de milho através de cultura de tecidos e células, tem despertado o interesse de vários grupos de pesquisa. Mutantes de milho tolerantes a herbicidas não seletivos seriam de grande importância tanto para a aplicação prática na agricultura como para a realização de estudos básicos. Muitos herbicidas não seletivos atuam na via biossintética de aminoácidos. Entre estes, encontra-se o glifosato que é um dos mais efetivos para inibir o crescimento tanto de ervas daninhas como das plantas cultivadas. Este composto tem sido amplamente utilizado na agricultura como herbicida de pré e pós emergência. O glifosato inibe preferencialmente a enzima 5-enolpiruvil shiquimato 3-fosfato sintetase (EPSPs) e inibe, conseqüentemente, a síntese dos aminoácidos aromáticos derivados do corismato.

Considerando-se a importância do milho para estudos básicos e aplicados, a importância de se compreender melhor os mecanismos genéticos-bioquímicos de herbicidas que atuam em via biossintética de aminoácidos, o enorme potencial das técnicas de cultura de tecidos

para seleção "in vitro" de mutantes bioquímicos e o amplo espectro de ação do herbicida glifosato, o presente trabalho teve como objetivos:

1. Avaliar o efeito do herbicida glifosato em diferentes linhagens de calos embriogênicos friáveis.
2. Estudar a possibilidade da utilização de calos embriogênicos friáveis para selecionar mutantes de milho tolerantes ao herbicida glifosato.
3. Realizar estudos bioquímicos de calos embriogênicos friáveis de milho tolerantes ao glifosato visando melhor compreensão dos mecanismos genéticos-bioquímicos envolvidos na tolerância a este herbicida.
4. Regenerar plantas a partir de calos embriogênicos de milho selecionados para tolerância ao herbicida glifosato.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Com o aprimoramento tecnológico na agricultura, o uso de herbicidas torna-se cada vez mais frequente no controle de ervas daninhas. O controle químico de ervas daninhas é uma ciência relativamente nova que envolve conhecimentos nas áreas de química e biologia.

Para a utilização de um herbicida adequado a uma determinada cultura, deve-se levar em consideração o seu modo de ação, a forma pela qual é metabolizado pelas plantas e as diferenças entre a planta cultivada e as espécies daninhas (HATZIOS & PENNER, 1981). Alguns dados sobre as reações das plantas cultivadas a agentes fitotóxicos e também a ecologia de ervas daninhas e cultivares (seletividade, tolerância e susceptibilidade) são importantes fatores a serem considerados (ASHTON & CRAFTS, 1981).

Com a introdução do herbicida no meio ambiente ocorrem processos físicos, químicos e bioquímicos que afetam a atividade, seletividade e função dos herbicidas. Esses processos podem ocorrer dentro e fora da planta, e são classificados de acordo com HATZIOS & PENNER (1981) como processos de transformação e transferência. Processos de transformação são aqueles que resultam na mudança da estrutura química do herbicida (transformação química, fotoquímica e biológica). Os processos de transferência movem o herbicida através de um composto ambiental ou organismos para outro sem alterar a estrutura química da molécula, tais como, absorção pela planta,

translocação dentro da planta e outros.

A classificação de herbicidas mais utilizada é dada em ordem alfabética do nome comum do produto químico ativo, nome comercial e o nome químico correspondente. Uma segunda classificação divide os herbicidas em grupos de compostos químicos semelhantes (herbicidas inorgânicos e orgânicos). A terceira classificação é dada em várias categorias baseadas na melhor ação do produto, onde as características de cada herbicida determinam seu modo de ação no campo, tais como, herbicida de aplicação foliar (contato, translocado e solo), herbicida não seletivo com aplicação foliar e no solo e, herbicidas aquáticos (ASTHON & CRAFTS, 1981). Segundo FEDTKE (1982) os herbicidas se classificam de acordo com seu modo de ação: inibidores de germinação, herbicida de contato, herbicida branqueador, dessecante e outros.

Do livro intitulado "Weed Control" (ANON., 1968), foi estabelecido que a expressão "mecanismo de ação" refere-se às lesões primárias bioquímicas ou biofísicas que causam a morte da planta e a expressão "modo de ação" refere-se à sequência inteira de eventos a partir da introdução do herbicida no meio ambiente até a eliminação da planta.

O estudo do modo de ação dos herbicidas deve oferecer uma descrição detalhada das reações físicas e moleculares dos herbicidas, bem como as mudanças estruturais e metabólicas induzidas. Estes estudos envolvem a absorção, translocação, reações moleculares, respostas bioquímicas e, o crescimento e estrutura da planta.

De acordo com LEBARON & GRESSEL (1982) os termos tolerância e resistência são definidos pelo grau de resposta a uma dada concentração de um herbicida, onde espécies tolerantes são obtidas a uma concentração determinada e espécies resistentes são selecionadas a qualquer concentração.

Os estudos básicos de absorção e translocação do herbicida pelas plantas e as diferenças entre as plantas, oferecem informações que permitem aos pesquisadores de ervas daninhas predizer quais as plantas que podem ser eliminadas por um dado herbicida e quais podem resistir. Para ser efetivo o herbicida deve ser absorvido pela planta-alvo e translocado para o sítio de ação molecular. Estes estudos variam de acordo com a espécie de planta estudada, mas também esses processos são influenciados por determinadas condições ambientais, tais como: temperatura, umidade e luz (FERNANDEZ, 1979).

As propriedades físicas e químicas da molécula do herbicida também podem influenciar a taxa da via de absorção e translocação. No início, os pesquisadores dependiam de estudos das mudanças anatômicas e morfológicas para determinar se um dado herbicida foi absorvido e translocado, dada a pequena quantidade do herbicida presente na planta. Atualmente, muito desses estudos utilizam-se de radioisótopos radioativos (usualmente ^{14}C) incorporados na molécula, permitindo a determinação de pequenas quantidades, incluindo a localização subcelular (ASTHON & CRAFTS, 1981).

Dados obtidos através do uso de herbicida marcados radioativamente podem ser obtidos por microautoradiografia ou

•
fracionamento subcelular de um homogeneizado do tecido. Entretanto, há um acúmulo preferencial do herbicida em uma estrutura celular, tal como o cloroplasto, mas isto não é indicação de que esta organela é, ou contém, o sítio ativo do herbicida. Efeitos fisiológicos do herbicida na planta surgem geralmente como efeito subletais, o que implica na mudança indireta do crescimento e composição da planta. Os efeitos bioquímicos são os que melhor demonstram o exato sítio de ação do herbicida, através do estudo da enzima ou complexo enzimático que estão envolvidos na inibição (FEDTKE, 1982).

Estudos sobre o mecanismo de ação de herbicidas permitiriam a utilização de herbicidas mais efetivos e menos tóxicos. Tais estudos devem oferecer informações de como estes compostos atuam nas plantas ao nível molecular, através da determinação do sítio primário de ação. Os herbicidas podem alterar inúmeros processos bioquímicos incluindo a fotossíntese, respiração, fosforilação oxidativa, síntese de RNA, síntese de proteínas, lipídeos e muitas outras reações.

2.1. Tolerância de plantas a herbicidas

Para muitas culturas ainda não há um herbicida disponível e que seja de uso apropriado. Uma maneira para resolver este problema seria o desenvolvimento de um herbicida novo e mais seletivo. Essa abordagem tornaria o processo muito prolongado e caro, pois para a descoberta de um novo herbicida ou nova formulação de um herbicida já existente, seriam necessários estudos das

características no campo, testes toxicológicos, comportamento da planta e outros (HUGHES, 1983).

Uma alternativa para a solução desse problema é a utilização de plantas cultivadas que apresentem uma seletividade modificada para resistência. O custo para o desenvolvimento de um novo cultivar é relativamente menor do que o custo de um novo herbicida, portanto é mais econômico selecionar um cultivar tolerante a um herbicida já existente do que o desenvolvimento de um novo herbicida mais seletivo (FAULKNER, 1982).

O conceito de herbicida seletivo, indica que espécies de plantas diferem em suas respostas aos herbicidas. Espécies pertencentes ao mesmo gênero ou família apresentam respostas mais semelhantes a um dado herbicida, do que espécies de famílias diferentes. Membros de Gramineae são mais resistentes ao 2,4-D, e a espécie anual **Veronica spp** é mais tolerantes ao paraquat. Todos os membros de uma espécie apresentam-se como um grupo homogêneo para a prática do controle de ervas daninhas (FAULKNER, 1982).

O estudo "in vivo" para caracterização e isolamento dos produtos metabólicos de plantas inteiras, após aplicação do herbicida para se obter tolerância é dificultado, pois este sofre influência de varias funções fisiológicas (absorção, translocação e metabolismo) que devem ser considerados nas respostas diferenciais encontradas entre as plantas. No caso, espécies resistentes a triazinas (milho, sorgo e cana), é baseado no rápido metabolismo do herbicida (JENSEN, 1982).

Uma alternativa para minimizar os efeitos das funções fisiológicas no metabolismo do herbicida em plantas inteiras, é a utilização da técnica de células isoladas, bem como a cultura de células e tecidos "in vitro". Estas técnicas permitem o isolamento de sistemas enzimáticos, fornecendo desta forma dados sobre o sítio primário de ação do herbicida e sua influência nas vias metabólicas (FEDTKE, 1982).

Herbicidas que interferem com funções metabólicas básicas é de se esperar que inibam o crescimento da cultura de células. Em tais casos, fenótipos tolerantes podem ser selecionados simplesmente como crescimento em presença de concentrações inibidoras do herbicida. Entretanto, herbicidas que interferem com funções de tecidos ou órgãos da planta toda (ex. fotossíntese), não tem efeito no crescimento da cultura de células heterotróficas (CHALEFF, 1986). A cultura de células de plantas oferece um grande número de vantagens nos estudos que envolvem o modo de ação dos herbicidas, bem como, para a seleção de células do tipo variantes, nas quais a resistência é expressa ao nível celular (CHALEFF, 1981; MEREDITH & CARLSON, 1982).

2.1.1 Utilização da cultura de tecidos para seleção de mutantes

O uso do sistema de cultura de tecidos para caracterizar fenótipos diferenciais em plantas, tem sido altamente

mencionado como uma metodologia que pode ser aplicada com sucesso em estudos que visam a obtenção de mutantes bioquímicos. Através deste sistema experimental, é possível a produção e seleção de variantes ou mutantes de tecidos ou linhas de células e conseqüentemente a planta toda. Populações de cultura de células geralmente contém variantes espontâneos (mutação), os quais apresentam um número de caracteres que diferem das demais células da população (HANDRO, 1981).

A obtenção de variantes através de cultura de tecidos pode ser através de seleção direta ou indireta, ou por testes individuais de um pequeno número de células derivadas de uma colônia. A seleção direta é a mais utilizada, onde um tipo celular apresenta uma capacidade de tolerar um composto tóxico e este é selecionado das demais células da população (MALIGA, 1984).

A seleção direta constitui uma das técnicas de enorme potencial para a identificação e seleção de células tolerantes a um determinado agente seletivo dentro de uma grande população de células em cultura. As células podem ser posteriormente multiplicadas e utilizadas para a regeneração de plantas (JACOBS, 1984).

De acordo com JACOBS (1984) os mutantes obtidos através de células submetidas a diferentes tratamentos podem ser classificados como auxotróficos, autotróficos e resistentes. As células auxotróficas caracterizam-se pela falta de habilidade para sintetizar metabólitos essenciais; as células autotróficas não requerem um fornecimento constante de componentes do meio de cultura normalmente requerido para o crescimento do tipo selvagem. Por outro lado, células resistentes não mostram inibição do crescimento na

presença de compostos que são inibidores sob condições normais.

Numerosos tipos de mutantes resistentes a determinados compostos químicos têm sido descritos. Eles podem ser classificados de acordo com a toxicidade do produto ou das condições utilizadas para seleção, tais como: aminoácidos, análogos de aminoácidos, antibióticos, análogo de base, fatores ambientais e várias toxinas.

Em linhagens de cenoura resistentes a 5-Metil-DL-triptofano (5MT), observou-se uma super produção do aminoácido triptofano. Este aumento do nível de triptofano livre tem sido relatado como uma alteração da enzima antranilato sintetase envolvida na biossíntese do triptofano. A linhagem de células resistentes apresentou menor sensibilidade da antranilato sintetase à inibição pelo triptofano ou 5MT do que as demais células (SUNG, 1979).

MIAO et al. (1988) em estudos para obtenção de calos resistentes de milho a 5MT, 5-2-aminoetil-L-cisteína (AEC) e altas concentrações de lisina+treonina (LT), observaram que a resistência à LT é herdada como um gene nuclear dominante. A resistência a 5MT apresentou esterilidade em macho e fêmea e a resistência para AEC foi causada por um decréscimo na sua absorção.

A resistência de linhagens de plantas resistentes a antibióticos, tais como, estreptomicina ou kanamicina, tem sido demonstrada ser controlada por uma mutação mendeliana recessiva, ou devido a modificações no material extracromossômico. No

caso de linhagens de tabaco, a resistência à estreptomicina parece ser devida a uma mutação no DNA do cloroplasto apresentando uma alteração em uma das proteínas ribossômicas (MALIGA, 1978).

Uma das grandes aplicações da cultura de tecidos em plantas cultivadas é o estudo que possibilita a obtenção de resistência contra fatores ambientais, tais como: alta e baixa temperaturas; metais pesados; fitotoxinas; sais; herbicidas e outros.

A tolerância à toxicidade salina é de grande interesse, pois com a irrigação ocorre um maior acúmulo de sais. NABORS et al. (1980) obteve sementes regeneradas de células de tabaco isoladas do meio rico em sais, e a progênie foi caracterizada como mais tolerante a irrigação com água contendo NaCl.

Linhagens de células resistentes a toxinas produzidas por **Helminthosporium maydis** têm sido isoladas da cultura de células de milho. Entre as plantas regeneradas, observou-se que a resistência é herdada maternalmente e muito provavelmente devido a uma modificação do DNA mitocondrial (GENGEBACK, 1977).

2.2. Seleção de mutantes tolerantes a herbicidas

O valor agronômico da tolerância a herbicidas é objeto de muita controvérsia. O valor efetivo do herbicida é baseado em sua

habilidade de discriminar entre as ervas daninhas e espécies cultivadas. Esta diferença tem sido tradicionalmente obtida pela seleção de um grande número de compostos químicos para identificar os que apresentam a ação específica desejada. O recurso genético para seleção de genomas que apresentam formas mutantes de espécies cultivadas que sejam mais tolerantes a um dado herbicida oferece uma alternativa mais refinada e barata (CHALEFF, 1986).

Apesar da dúvida sobre o valor agrônomico da engenharia genética para tolerância a herbicidas, tais estudos irão contribuir para o entendimento dos mecanismos de ação do herbicida (CHALEFF, 1986). A seleção "in vitro" para tolerância a herbicidas pode produzir novos recursos para variabilidade genética, onde fenótipos tolerantes podem ser selecionados e com a combinação de técnicas de melhoramento convencionais, novos herbicidas em culturas tolerantes podem ser estabelecidos.

Entretanto, segundo MEREDITH & CARLSON (1982), para estudos genéticos que visam a tolerância à herbicida através do uso de cultura de tecidos, alguns pré-requisitos devem ser considerados, tais como: (1) Se a tolerância é expressa em cultura de células, mas é perdida quando as células são submetidas ao crescimento fora do meio de seleção, provavelmente estas linhas de células sofrem uma adaptação bioquímica na presença do inibidor; (2) Se a tolerância é retida por cultura de células mesmo depois de uma ou mais passagens sem o herbicida; (3) Se a tolerância é estável na ausência do inibidor e é também expressa em plantas regeneradas da cultura de células ou de cultura de células derivadas de plantas regeneradas; (4) Se a tolerância é estável e retida no processo de regeneração e é

também transmitida para a progênie de plantas regeneradas.

O estudo baseado em características específicas da estrutura diferenciada mais do que no metabolismo celular pode ou não ser expresso em cultura de células. Similarmente, cultura de células selecionadas para tolerância pode não necessariamente regenerar plantas. Em alguns experimentos a tolerância foi testada somente ao nível celular e em outros foi analisada também em plantas regeneradas e suas progênies (BRADSHAW, 1982).

A técnica de cultura de tecidos tem sido utilizada como sistema para testes de fitotoxicidade e para estudos do metabolismo de herbicidas (CROCOMO & OCHOA-ALEJO, 1983). Alguns progressos tem sido obtidos nos estudos que visam a obtenção de linhagens de células ou cultivares tolerantes a alguns herbicidas, tais como, o amitrole em cultura de células de tabaco (SINGER & MCDANIEL, 1984), o herbicida picloram em células de tabaco (CHALEFF & PARSONS, 1978; CHALEFF, 1980; 1981) e o herbicida paraquat em cultura de células de *Nicotiana tabacum* (HUGHES, 1983) e em células de tomate (THOMAS & PRATT, 1982).

A ação do herbicida sobre o metabolismo celular é uma consequência da atividade enzimática diferencial entre as espécies tolerantes e sensíveis. Desse modo é necessário um maior entendimento da enzimologia da degradação do herbicida e sua implicação na seletividade ao herbicida. As enzimas que catalisam a biotransformação em plantas superiores são geneticamente controladas e o melhoramento de plantas cultivadas para tolerância a herbicidas por incorporação de genes que regulam a atividade enzimática oferece

um grande potencial de estudos. A seleção de plantas mutantes deficientes de enzimas metabólicas chaves ou outros catalisadores, pode demonstrar as reações que estão envolvidas no metabolismo de herbicidas por plantas superiores.

Há várias vantagens no uso de plantas "in vitro" para o desenvolvimento dos estudos enzimáticos da ação de herbicidas, tais como: (1) Permite o estudo dos passos metabólicos específicos em condições controladas e definidas; (2) Elimina a possibilidade de formação de produtos secundários e facilita o isolamento e identificação de metabólitos e intermediários; (3) Rápido estudo do efeito de muitos substratos e inibidores nos passos das reações metabólicas chaves; (4) Comparação da atividade enzimática em diferentes espécies de plantas e tecidos; (5) Localização dos passos de reações metabólicas específicas são mais manejáveis; (6) Influência de fatores ambientais podem ser eliminados ou controlados (MEREDITH & CARLSON, 1982).

O conhecimento dos sistemas de enzimas que catalisam as reações chaves durante o metabolismo do herbicida possibilitaria o estímulo ou inibição da enzima. Com isso, aumentar-se-ia o espectro de seletividade de alguns herbicidas, permitindo o desenvolvimento de plantas cultivadas com alta tolerância a um aumento da eficiência do herbicida a ser utilizado para eliminar as espécies daninhas.

Recentes progressos na identificação das enzimas da via biossintética dos aminoácidos, bem como a demonstração do alvo que confere resistência ao herbicida são, pelo menos em parte, atribuídos aos estudos que utilizam a técnica de cultura "in vitro"

(LAROSSA & FALCO, 1984; CHALEFF, 1986). De acordo com a Figura 1 podemos observar a ação de vários herbicidas na via biossintética de aminoácidos (LAROSSA & FALCO, 1984).

Vários estudos com diferentes herbicidas já foram realizados aplicando-se a técnica de cultura de tecidos, sendo que os herbicidas aplicados possuem diferentes formas de ação. O entendimento molecular do modo de ação do herbicida poderá, através da engenharia genética, produzir plantas cultivadas tolerantes a um herbicida específico, bem como, auxiliar na criação de um novo herbicida (HARDY & GIAQUINTA, 1984).

Existem herbicidas que inibem especificamente enzimas da via biossintética de aminoácidos, incluindo o glifosato (STEINRUCKEN & AMRHEIN, 1980), tipos de sulfoniluréia (RAY, 1986; CHALEFF & MAUVAIS, 1984; CHALEFF et al., 1985; CREASON & CHALEFF, 1988; SWANSON et al., 1988), as imidazolinonas (SHANER et al., 1984) e fosfotricinas (DEAK et al., 1988). Para cada um desses herbicidas, linhagens de células variantes têm sido selecionadas, nas quais a tolerância foi claramente correlacionada com mudanças qualitativas ou quantitativas na enzima alvo (AMRHEIM et al., 1983; CHALEFF & RAY, 1984; SHANER & ANDERSON, 1984, 1985)

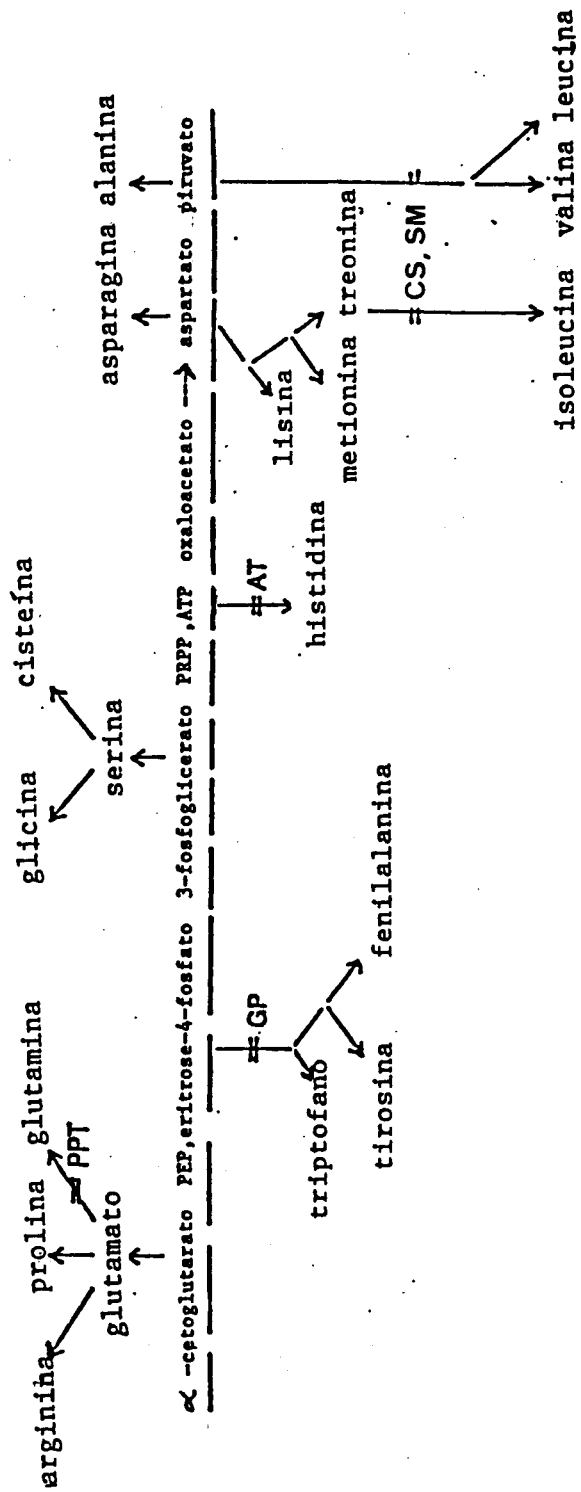
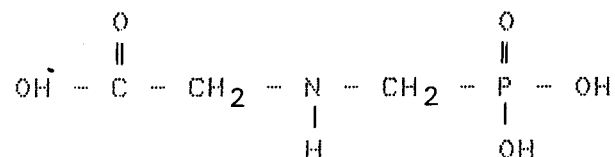


FIGURA 1. Representação parcial da via biossintética dos aminoácidos com a ação de alguns tipos de herbicidas, tais como, fosfotricinas (PPT), glifosato (GP), aminotriazoles (AT), Chlorsulfuron (CS) e Sulfometuron (SM).

2.2.1. Herbicida glifosato

O glifosato [N (Fosfonometil) glicina] possui um amplo espectro de ação, não seletivo, com potencial para o controle de ervas daninhas perenes devido a sua rápida translocação, sendo utilizado como herbicida pré e pós emergente (FERNANDEZ, 1979; ASHTON & CRAFTS, 1981; HERBICIDE HANDBOOK, 1983). Apresenta-se com o nome comercial de Roundup (Monsanto Co., St. Louis, MO, USA) e com a seguinte fórmula estrutural :



Estudos realizados com **Lemna gibba** e **Rhizobium japonicum** sugerem que o herbicida glifosato inibe a biossíntese de aminoácidos aromáticos (JAWORSKI, 1972). Posteriormente, foi demonstrado que o glifosato causou uma redução na fotossíntese da planta inteira por 72 horas (SPRANKLE et al., 1975), afetou a ultraestrutura do cloroplasto e induziu aberração cromossômica (CAMPBELL et al., 1976).

A biossíntese dos aminoácidos aromáticos provém da via do ácido shiquímico e, ocorre apenas em plantas e microrganismos. Estudos químicos dos intermediários da via tem sido

realizados há mais de 20 anos. O conhecimento das enzimas que catalisam individualmente as reações permanece fragmentado (AMRHEIN et al., 1987). A enzima 5-enolpiruvil shiquimato sintetase (EPSPs) (EC 2.5.1.19) é a mais estudada, MOUSDALE & COGGINS (1984), SMART et al. (1985), STEINRUCKEN et al. (1986) purificaram a enzima de plantas até homogeneidade eletroforética e uma purificação parcial foi obtida na cultura de **Nicotiana silvestris** (RUBIN et al., 1984).

Estudos enzimáticos iniciais, propõem ser o herbicida glifosato inibidor ou repressor da enzima corismato mutase e/ou prefenato desidratase. Estas duas enzimas participam da via biossintética dos aminoácidos aromáticos e da síntese de compostos fenólicos que ocorrem na planta (JAWORSKI, 1972).

De acordo com os estudos de AMRHEIN et al. (1980), HOLLANDER & AMRHEIN (1980), STEINRUCKEN & AMRHEIN (1980), o glifosato inibe a formação dos compostos fenilpropanóides e reduz a concentração de fenilalanina. HOLLANDER & AMRHEIN (1980) observaram que o glifosato inibe a incorporação de shiquimato C em aminoácidos aromáticos, causando um grande acúmulo de shiquimato nos tecidos das plantas de **Fagopyrum esculentum** Moench e bloqueia a formação de pigmentos antraquinonas, os quais são biossinteticamente derivados do corismato em cultura de células de plantas. Estes resultados demonstram que o glifosato inibe um passo enzimático na rota do shiquimato para o corismato indicando ser a enzima EPSPs, o alvo de ação do herbicida glifosato (STEINRUCKEN & AMRHEIN, 1980). A EPSPs inibe a síntese dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina, a Figura 2 adaptada de GILCHRIST & KOSUGE (1980) e AMRHEIN et al. (1987) ilustra a via dos aminoácidos aromáticos. A EPSPs catalisa a

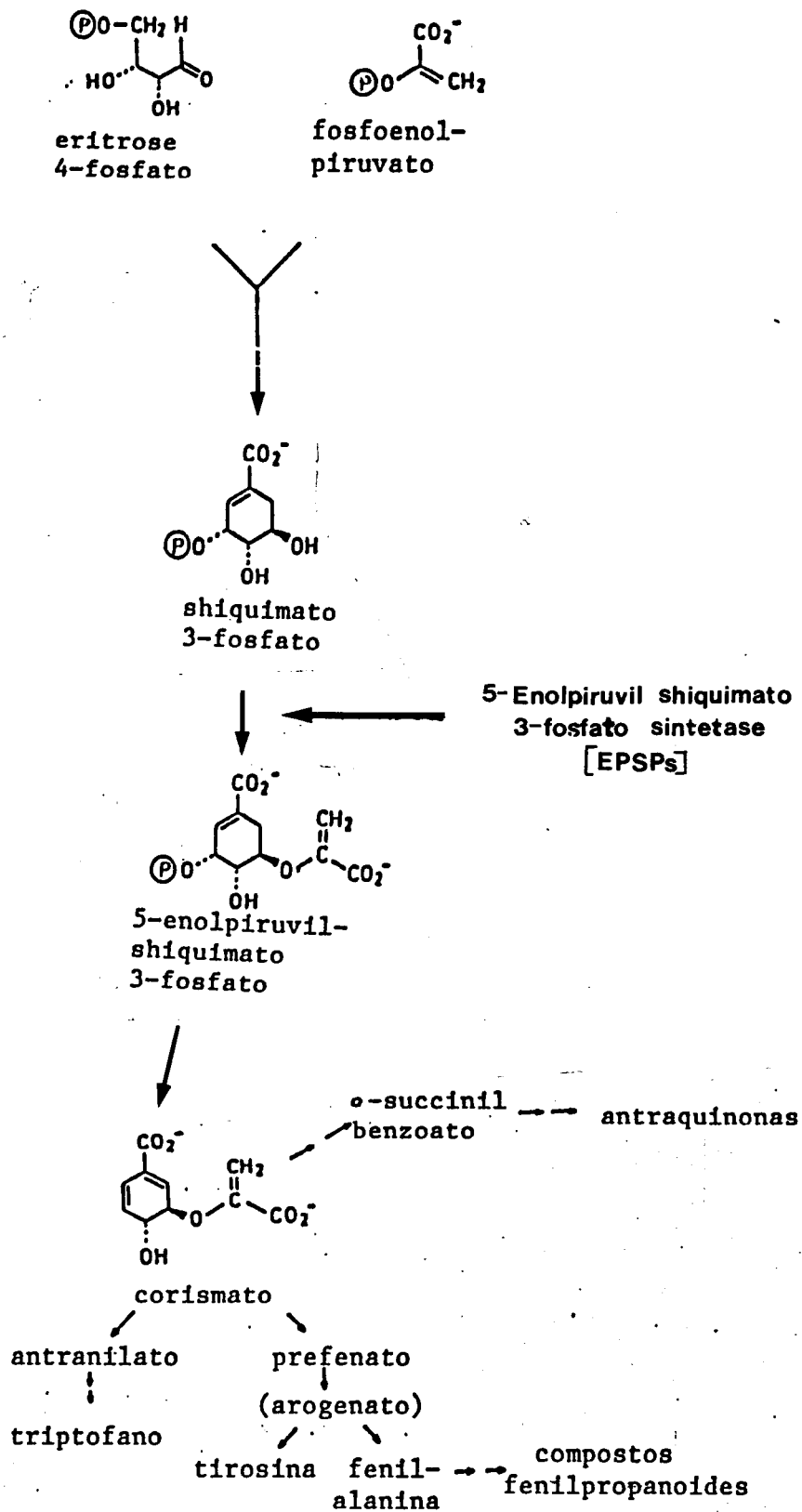


FIGURA 2. Representação parcial da via biossintética dos aminoácidos aromáticos.

reação transferindo um grupo enolpiruvil (carboxivinil) do fosfoenol piruvato (PEP) para o grupo 5-hidroxil do shiquimato 3-fosfato (S3P) com a concomitante liberação de fósforo inorgânico (AMRHEIN et al., 1987).

O efeito do herbicida glifosato em cultura de células de plantas pode ser completamente revertido pela adição ao meio de cultura de combinações de fenilalanina, tirosina e/ou triptofano e caseína hidrolisada (HADERLIE et al., 1977) ou na ausência de caseína hidrolisada (SMART et al., 1985), confirmando que a ação do glifosato resulta na inibição da síntese dos três aminoácidos aromáticos.

O grande acúmulo de shiquimato em cultura de células de plantas tratadas com glifosato (AMRHEIN et al., 1980; ISHIKURA & TAKESHIMA, 1984; SHAH et al., 1986) e a inibição da formação de antraquinonas derivadas do corismato na cultura de células de **Gallium mollugo** (AMRHEIN et al., 1980) estão de acordo com o postulado de que a enzima EPSPs, catalisadora da sexta reação da via do shiquimato, é a enzima alvo do herbicida glifosato. O shiquimato é acumulado mais do que o shiquimato 3-fosfato (S3P) na presença do glifosato, devido a uma desfosforilação do S3P e armazenamento de shiquimato livre nos vacúolos (HOLLANDER & AMRHEIN, 1983).

Evidências de que a EPSPs é o alvo principal do glifosato em bactérias tem colaborado para essas observações. Em **Escherichia coli**, a amplificação do gene que codifica a EPSPs aumenta a tolerância ao glifosato (DUNCAN, 1984). Em **Salmonella**

typhimurium e **Areobacter aerogenes**, a tolerância tem sido demonstrada ser devido a mudanças na estrutura da EPSPs, alterando o sítio de ligação do glifosato (AMRHEIN et al., 1983; COMAI et al., 1985). De acordo com as observações realizadas em cultura de células de **Corydalis sempervirens** (AMRHEIN et al., 1983) e **Daucus carota** (NAFZIGER et al., 1984) a tolerância ao glifosato está correlacionada com altos níveis de atividade da EPSPs.

Cultura de células de **Daucus carota** (NAFZIGER et al., 1984), **Corydalis sempervirens** (AMRHEIN et al., 1983; SMART et al., 1985), **Petunia hybrida** (STEINRUCKEN et al., 1986) e **Fagopyrum esculentum** (HOLLANDER-CZYTKO, 1986) tem sido adaptadas ao crescimento em altas concentrações de glifosato através de transferências progressivas em meio de cultura contendo concentrações crescentes de herbicida. A tolerância ao herbicida foi devido a um aumento de 40X no nível da atividade da enzima EPSPs em **Corydalis sempervirens**, enquanto que outras enzimas da via do shiquimato não foram afetadas. É importante ressaltar que a tolerância não afeta a sensibilidade da enzima ao herbicida, portanto apenas o aumento da concentração da enzima sensível já é suficiente para tornar a planta tolerante.

NAFZIGER et al.(1984) utilizaram células de cenoura que apresentavam crescimento em meio contendo 0,25mM de glifosato, as quais foram transferidas para meio contendo concentrações progressivamente maiores do herbicida. As células adaptadas foram mantidas por um ano (15 subculturas) em 25mM de glifosato e mais dois anos em meio sem herbicida. A alteração na resposta ao herbicida parece ser estável, pois a concentração que inibiu 50% do crescimento foi de 0,12mM para células não selecionadas

e 6,3mM para as selecionadas, isto indica um aumento de 52X da tolerância nas células selecionadas. Foi também observado um aumento de 12X na atividade específica da EPSPs nas células selecionadas. O aumento do peso fresco durante 10 dias de incubação em meio sem glifosato foi de 7,7g (células selecionadas) e 15,5g (não selecionadas). A absorção de glifosato ¹⁴C foi rápida e linear durante as primeiras oito horas de transferência. A radioatividade decaiu durante as próximas 40 horas. Não houve diferença na cinética de absorção entre as células selecionadas e não selecionadas.

Em cultura de **Corydalis sempervirens** as células não selecionadas apresentaram uma inibição em 0,2mM de glifosato, enquanto que aquelas selecionadas foram inibidas apenas na concentração de 25,0mM do herbicida. Células selecionadas apresentaram uma tolerância de 100X maior quando comparadas com as não selecionadas. A EPSPs purificada das células selecionadas bem como das não selecionadas, possui as mesmas propriedades físicas, cinéticas e imunológicas (SMART, 1985).

SMITH et al.(1986) isolaram variantes de células de tomate tolerantes ao glifosato, onde a atividade da enzima EPSPs apresentou um aumento de 8 a 13X em relação às células não selecionadas. Os resultados sugerem uma super produção da EPSPs sensível ao glifosato. Não obtiveram regeneração de plantas férteis das variantes, mas partes aéreas anormais e calos de folhas dessas partes aéreas ainda mantêm a tolerância ao glifosato.

SHAH et al.(1986) demonstraram que a base molecular para tolerância ao glifosato nas células de **Petunia**

hybrida selecionadas na presença do herbicida é a amplificação do gene que codifica a enzima EPSPs. Baseando-se nessa informação os autores produziram plantas transgênicas, onde o gene da EPSPs foi colocado sob o controle de um promotor que determina a alta expressão desse gene. Com isso obtiveram tolerância ao herbicida glifosato. Estes estudos contribuíram enormemente para métodos modernos de clonagem e sequenciamento do gene e também para super produção do produto gênico (DUNCAN et al., 1984; STALKER et al., 1985).

De acordo com os estudos de AMRHEIN et al. (1987), os mecanismos de insensibilidade da enzima alvo (EPSPs) ao glifosato devido a uma mutação e a super produção da enzima, permitem adicionar ou afirmar conclusões com referências ao modo de ação do herbicida. O primeiro mecanismo tem sido obtido em bactérias (COMAI et al., 1983; SCHULTZ et al., 1984). O gene que codifica a enzima EPSPs resistente ao glifosato em **Salmonella typhimurium** foi clonado e sequenciado (STALKER et al., 1985). Uma simples substituição de um aminoácido na estrutura da enzima confere resistência ao herbicida. Este gene tem sido utilizado para transformar plantas de tabaco, as quais apresentaram um aumento da tolerância ao glifosato (COMAI et al., 1985).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Foram utilizadas três linhagens homozigóticas de milho (Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1) pertencentes ao Banco de Germoplasma do Departamento de Genética e Evolução, I.B., Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), S.P., Brasil. A linhagem TuxMo-1 foi derivada de uma população composta de 87,5% de germoplasma "Tuxpeño", que é uma raça de milho dente adaptada a baixas altitudes da Costa Atlântica do México, e de 12,5% da linhagem americana Mo-5. As linhagens Cat100-1 e Cat100-6 foram derivadas da raça "Cateto" adaptada ao sul da Costa Atlântica do Brasil.

De acordo com experimentos realizados por PRIOLI (1987), foi demonstrado que essas linhagens apresentaram, em cultura de tecidos, calos embriogênicos friáveis adequados para o desenvolvimento deste trabalho.

3.2. Cultura de tecidos

3.2.1. Calos embriogênicos friáveis

Foram utilizados calos embriogênicos friáveis (Tipo II) das linhagens Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1, obtidos no laboratório de Genética e Evolução, I.B., UNICAMP. Os calos Tipo II foram isolados a partir de calos embriogênicos compactos (Tipo I), iniciados a partir de embriões imaturos, cerca de 12 a 24 meses antes da realização dos experimentos (PRIOLI, 1987).

3.2.2. Manutenção de calos

Os calos embriogênicos friáveis foram mantidos em placas de Petri (100mm X 15mm) contendo 25ml de meio de cultura (MB-1) consistindo de sais N6 (CHU et al., 1975), tiamina-HCl (15 μ M), ácido nicotínico (7,5 μ M), piridoxina (7,5 μ M), inositol (550 μ M), glicina (2mg/l), 2,4-D (10 μ M), sacarose (3%) e gelrite (Kelco Co.; 2,4g/l), ver Tabela 1. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Os calos foram mantidos no escuro a 28 \pm 1° C e as subculturas foram realizadas a cada 15 dias.

3.3. Tolerância de calos embriogênicos ao herbicida glifosato

3.3.1. Determinação da concentração subletal do herbicida glifosato para calos embriogênicos friáveis.

Para a determinação da concentração subletal o

TABELA 1. Composição do meio de cultura (MB-1) utilizado para a manutenção e seleção de calos embriogênicos friáveis de milho consistindo de macro e micronutrientes do meio N6 (Chu et al., 1975).

Macronutrientes

I	1.	$(\text{NH}_2) \text{SO}_4$	463 mg/l
II	2.	KNO_3	2830 mg/l
III	3.	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	166 mg/l
IV	4.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	185 mg/l
	5.	KH_2PO_4	400 mg/l
V	6.	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8 mg/l
	7.	$\text{Na}_2 - \text{EDTA}$	37,2 mg/l

Micronutrientes

VI	8.	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4,4 mg/l
	9.	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg/l
	10.	H_3BO_3	1,6 mg/l
	11.	KI	0,8 mg/l
	12.	$\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25 mg/l
	13.	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025 mg/l
	14.	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025 mg/l

glifosato foi utilizado em sua forma comercial (480g de glifosato/litro) produzida pela Monsanto Co. (Roundup). Amostras de calos embriogênicos friáveis (4-8mg) das linhagens Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1 mantidas em meio de cultura MB-1 foram utilizadas nestes experimentos. Soluções aquosas do herbicida glifosato foram esterilizadas por filtração (filtro Millipore 0,44µm) e adicionadas ao meio de cultura com temperatura aproximada de 50-60 C. De acordo com experimentos realizados anteriormente (Figura 3), o gradiente de concentração do herbicida a ser utilizado para a linhagem TuxMo-1 foi de 0, 0,075, 0,15, 0,30, 0,60, 0,90, 1,20, 1,50, 1,80, 2,10 e 2,40 mM. Subsequentemente, para as linhagens Cat100-1 e Cat100-6 as concentrações de glifosato utilizadas foram de 0, 0,30, 0,60, 1,20, 1,50, 1,80, 2,10 e 2,40 mM. As culturas foram mantidas no escuro a 28±1°C.

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento. Cada repetição consistiu de 10 amostras de calos colocados sobre 25ml de meio de cultura em uma placa de Petri plástica (100mm X 15mm). A avaliação da taxa de crescimento foi realizada através da medida de peso fresco 30 dias após a inoculação. Foram consideradas como concentrações subletais aquelas onde o crescimento dos calos foi reduzido entre 70-95% em relação ao controle (HADERLIE et al., 1977).

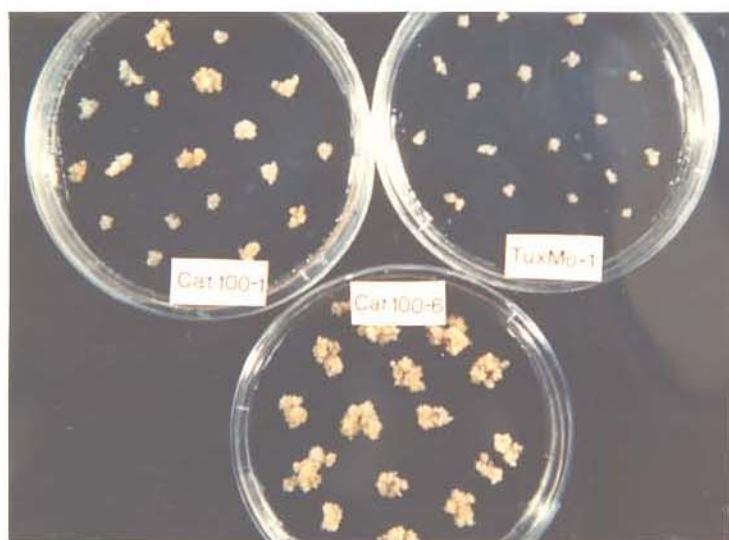


FIGURA 3. Calos embriogênicos friáveis das linhagens de milho Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1, submetidos ao tratamento com glifosato na concentração de 0,3mM.

3.3.2. Seleção de calos embriogênicos friáveis tolerantes ao herbicida glifosato

Calos embriogênicos friáveis de milho foram utilizados para a seleção de células tolerantes ao glifosato. Foi utilizado um total de 500 amostras de calos pesando entre 4 a 8mg de cada linhagem. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 25 repetições. Cada repetição consistiu de 20 amostras de calos em uma placa de Petri contendo 25ml de meio MB-1 ou meio MB-1 suplementado com as seguintes concentrações subletais de glifosato comercial: (1) 0,30mM para a linhagem TuxMo-1; (2) 0,60mM para a linhagem Cat100-1; (3) 2,40mM para a linhagem Cat100-6. Amostras de calos (4-8mg) colocadas sobre meio MB-1 sem herbicida foram mantidas nas mesmas condições de crescimento e utilizadas como controle. As culturas foram mantidas no escuro a 28±1° C. Após 30 dias os setores de calos tolerantes foram transferidos para o mesmo meio contendo herbicida. Os calos tolerantes foram mantidos em meio seletivo e os calos controles em meio MB-1, com subculturas a cada 15 dias. Após 10 subculturas, amostras de calos tolerantes das três linhagens de milho foram transferidas para meio básico MB-1 sem herbicida com a finalidade de testar a possibilidade de adaptação ao meio de cultura. Após dez subculturas em intervalos de 15 dias, os calos foram novamente transferidos para meio seletivo contendo glifosato comercial nas concentrações de 0, 0,30, 0,60, 1,20, 2,40 e 4,80 mM. Após 30 dias os calos foram avaliados para tolerância ao herbicida.

3.3.3. Efeito do glifosato puro

Calos controle e tolerantes das linhagens Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1, foram submetidos a um gradiente de concentração de glifosato puro (98,9%), obtido do Laboratório de Bioquímica da Monsanto (St.Louis,MO,USA). Foram utilizados os calos submetidos a 10 subculturas em meio seletivo seguidos de 10 subculturas em meio não seletivo. Utilizou-se o meio de cultura MB-1 suplementado com glifosato puro nas concentrações de 0, 0,25, 0,50, 0,75 e 1,0 mM.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento. Para cada repetição foram utilizados 20 calos em uma placa de Petri contendo 25ml de meio de cultura. Após 30 dias foi realizada a medida do peso fresco dos calos para determinação da taxa de crescimento e resposta de tolerância ao herbicida.

3.4. Tolerância de plântulas ao herbicida glifosato

O efeito do herbicida glifosato no crescimento de plântulas das linhagens Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1 foi avaliado utilizando-se solução nutritiva com a seguinte composição (PRIOLI, 1987):

KH_2PO_4 - 136,1g/l

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 246,1g/l

KNO_3 - 101,9g/l

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 236,1g/l

Solução de micronutrientes (2,86g/l H_3BO_3 ; 1,81g/l MnCl_2 ;
0,22g/l ZnSO_4 ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,009g/l H_2MoO_4)

Solução de Fe_2EDTA (33,2g/l Na_2EDTA ; 3,65g/l NaOH ; 25g/l
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Sementes das linhagens foram pré-germinadas em papel de germinação (GERMITEST) umedecido com água destilada durante três dias. Em seguida as plântulas foram transferidas para placas de isopor perfurada, de tal modo que as radículas ficassem mergulhadas na solução nutritiva. A seguir, as placas de isopor contendo 75 plântulas/placa foram colocadas em caixas plásticas (12 litros) contendo 10 litros de solução nutritiva nutritiva suplementada com 0, 0,03, 0,06 e 0,12 mM de glifosato comercial. As caixas plásticas com as plântulas foram mantidas em uma câmara de crescimento com temperatura de $28 \pm 1^\circ \text{C}$, fotoperíodo de 14/8 horas luz/escuro (aproximadamente $125 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) e com aeração forçada contínua para oxigenação. Diariamente adicionava-se água destilada e deionizada para manter o volume da solução. Após 7 dias, o crescimento das plântulas foi estimado através da medida do comprimento radicular, peso seco da raiz e da parte aérea. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 25 repetições por tratamento para cada linhagem.

Para verificar a natureza das diferenças entre os

calos selecionados e controles, uma série de análises bioquímicas foram realizadas.

3.5. Absorção de glifosato ^{14}C em calos embriogênicos

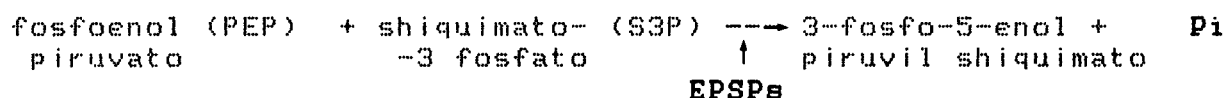
Amostras de aproximadamente 50mg de calos tolerantes e controle das três linhagens de milho foram transferidas para 2ml de meio líquido MB-1 contendo glifosato marcado com ^{14}C (aprox. $0,43\mu\text{Ci}/\text{mmol}$). Os calos foram incubados neste meio durante 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 4,0 horas, sob agitação a aproximadamente 130rpm. Após estes períodos de incubação, os calos foram retirados do meio de cultura contendo glifosato- ^{14}C e imediatamente lavados (três vezes durante 2 min.) com meio líquido MB-1 contendo $0,25\text{mM}$ de glifosato não marcado. A seguir foram desidratados em estufa a 60°C e posteriormente pesados. A seguir, foram adicionados 5ml de uma solução consistindo de 2,5-difenioxazólico (PPO)(4%) e 1,4-bis[2-(5-feniloxazólico)]-benzeno (POPOP)(0,1%) dissolvidos em tolueno. A radioatividade (cpm/mg de calo) foi determinada com um auxílio de um cintilador líquido (LKB). Foram utilizadas contagens de 2 min. e três repetições para cada tratamento.

3.6. Determinação da atividade da enzima 5-enolpiruvil shiquimato sintetase (EPSPs)

3.6.1. Determinação da atividade específica através da liberação de Pi

A atividade da enzima 5-enolpiruvil shiquimato 3-fosfato sintetase (EPSPs) foi medida em calos com e sem tratamento das linhagens Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1, de acordo com a metodologia recomendada por KISHORE (comunicação pessoal).

Foram utilizadas amostras de 1g (peso fresco) de calos tolerantes após 10 subculturas em meio seletivo seguidas de 10 subculturas em meio MB-1 e calos controle após 20 subculturas em meio MB-1. Os calos foram colocados sob meio MB-1 contendo glifosato puro nas concentrações de 0, 0,25, 0,50, 0,75 e 1,0 mM e mantidas por 30 dias. Foram realizadas três repetições por tratamento. A atividade enzimática foi determinada através da quantificação de fósforo inorgânico (Pi) liberado da reação:



3.6.1.1. Preparo e purificação do extrato bruto de calos

Os calos foram retirados do meio contendo glifosato puro e lavados (1 x 10 seg.) com água destilada. Após retirar o excesso de água com um papel absorvente, os calos foram macerados em nitrogênio líquido por 2 min. e homogeneizados em 2 ml de tampão de extração consistindo de Tris-HCl pH 7.5 (100mM), EDTA(1mM), glicerol(10%), DTT(5mM), benzamidina (BAM) (1mM), albumina bovina (BSA) (1g/l). O experimento foi realizado a 4°C. A seguir, o extrato foi colocado em tubos de ensaio do tipo "eppendorf" e centrifugado durante 5 min. a 15.000xg. O sobrenadante foi purificado em coluna de Sephadex G-25.

Para o preparo das colunas, Sephadex G-25 pré-umedecido com água foi colocada em seringas plásticas descartáveis de 1ml. A resina foi empacotada até obtenção de 1ml de volume através de várias centrifugações a 3.000xg durante 4 min. (Centrífuga FANEM - Excelsa Baby). As colunas de resina Sephadex G-25 foram equilibradas com o tampão de extração previamente descrito sem glicerol, BAM e BSA e mantidas a 4°C.

Amostra de 2 ml do sobrenadante do extrato de cada um dos tratamentos foram cuidadosamente pipetados no topo das colunas de Sephadex G-25 e submetidas a centrifugação durante 4 min. a 4°C. Os extratos assim purificados foram coletados, diluídos 1:5 em tampão HEPES pH 7,0 (50mM), e então utilizados para determinação da

atividade da enzima EPSPs.

3.6.1.2. Ensaio da EPSPs

Para a realização da reação enzimática foi utilizada uma solução consistindo de shiquimato 3-fosfato (S3P) (20mM), fosfoenolpiruvato (PEP) (10mM), molibidato de amônio (1,0mM) e HEPES (50mM) pH 7,0 e como controle foi utilizada a mesma solução sem S3P. A solução foi mantida a 25°C por 1 a 2 min.. A reação para determinar a atividade da enzima foi realizada misturando-se 10µl do extrato purificado com 40µl da solução contendo os substratos da enzima. A incubação foi realizada durante 5 min. a 25°C. A seguir, a mistura de reação foi transferida para banho de gelo para interromper a reação enzimática.

3.6.1.3. Determinação de Pi liberado

Para a determinação do Pi liberado na reação enzimática, foram utilizados 50µl da mistura de reação da enzima e como controle, 50µl de uma solução padrão de Pi (H_2PO_4). À mistura de reação e a solução controle foram adicionados 0,8ml de uma solução consistindo de 300ml de verde malaquita (0,045%), 10ml de molibidato de amônio (4,5%), 8ml de tergitol (0,2%). Após 1 minuto adicionou-se 0,1ml de citrato de sódio(33%). O período de incubação foi de 20-25 min. e a absorbância a 660nm foi medida utilizando-se um

espectrofotômetro VARIAN (série 634). O padrão da atividade da enzima EPSPs foi calculado em nmol de Pi liberado/min., tomando-se como base uma curva padrão de Pi de 0; 2,5; 5; 7,5 e 10nmol de $\text{Pi}(\text{H}_2\text{PO}_4)$.

3.6.1.4. Dosagem de proteína total do extrato bruto de calos

Para determinação da quantidade de proteína total do extrato bruto de calos controles e tolerantes ao glifosato das três linhagens de milho, utilizou-se a método de Bradford modificado descrito por Sepektor (1978). Foram utilizadas três amostras (10 μ l) do sobrenadante dos extratos brutos de calos preparados como descritos anteriormente (item 3.6.1.1.). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a um comprimento de onda de 590nm (espectrofotômetro VARIAN - série 634).

3.6.2. Determinação da atividade específica da enzima EPSPs pelo método de HPLC

A análise da atividade específica da enzima EPSPs através do método de Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC), nos calos controle e tolerante das linhagens Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1 foi realizada no Laboratório de Bioquímica da Monsanto (St.Louis,MO,USA).

Utilizou-se amostras de calos das linhagens TuxMo-1 e Cat100-1 (1g/peso fresco) tolerantes através de 10 subculturas em meio seletivo e 10 subculturas em meio MB-1 e, calos controle submetidos a 20 subculturas em meio MB-1. Para a linhagem Cat100-6 foram analisados calos controle e tolerantes submetidos a um gradiente de glifosato comercial de 0 a 2,4mM.

O preparo dos extratos obedeceu os procedimentos utilizados no item 3.6.1.1., onde após os extratos serem filtrados nas colunas de Sephadex G-25, foram utilizados para a análise da EPSPs.

A reação enzimática utilizada consistiu de HEPES (50uM), S3P (2mM), molibdato de amônia (0,1mM), KF (5mM), extratos das amostras (10ul), H₂O (10 a 5ul) e PEP-¹⁴C (1mM). A solução, sem PEP-¹⁴C, foi incubada a 25°C por 1:30 horas. A reação foi iniciada com adição de PEP-¹⁴C e transferidas para banho de 25°C por 2 min.

A atividade da EPSPs foi analisada através da utilização de ensaios radioativos por HPLC. Condições da HPLC: Coluna de troca iônica (Synchropak AX100), Coluna guarda ("Reverse Phase, C18"), Tampão de corrida (0,3M KH₂PO₄, pH 6,5 com NaOH), Tempo de corrida (aproximadamente 20 min. por ensaio)

A proteína foi determinada através de ensaio por BioRad. A atividade específica foi expressa em nmol de EPSPs formado/min.mg proteína.

3.7. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida.

Eletroforese de proteínas totais de calos das três linhagens foi realizada de acordo com a metodologia descrita por LAEMMLI (1970) em gel de gradiente de 5-20% de poliacrilamida. Foram utilizados calos controle e tolerantes submetidos a diferentes concentrações de glifosato puro, como descrito no item 3.3.3.

3.7.1. Preparo das amostras

Foram utilizadas amostras do sobrenadante dos extratos brutos de calos descritos no item 3.6.1. contendo aproximadamente 60µg/ml de proteína total. Os extratos foram diluídos na proporção de 1:1 no tampão da amostra consistindo de:

Tris-glicina	0,3g
SDS - 10%	0,2ml
sacarose 40%	2,5ml
H ₂ O	6,2ml
Bromofenol Blue 0,1%	0,1ml
2-Mercaptoetanol	0,2ml

As amostras em tubos de "eppendorf" foram colocadas em banho de água fervente durante três minutos para permitir a denaturação das proteínas.

3.7.2. Preparo dos géis de SDS-poliacrilamida

O gel de resolução de poliacrilamida foi preparado com as seguintes soluções:

	5% (10ml)	20% (10ml)
Acrilamida-Bisacrilamida (30:0,8)	1,67	6,67
Tris-HCl pH 8,8 (0,375M)	1,24	1,24
SDS 10%	0,10	0,10
Persulfato de amônio (1,5%)	0,24	0,24
Glicerol (87%)	-	1,15
H ₂ O	6,76	0,76
TEMED	3,30	3,30

O gel de resolução foi aplicado em aparato vertical em placa de vidro (16,5x14x0,15 cm) com gradiente de 5-20% de acrilamida. A seguir, foi aplicado o gel de empacotamento consistindo de:

Acrilamida-Bisacrilamida (30:0,8)	1,30ml
SDS 10%	2,50ml
Persulfato de amônio (1,5%)	0,75ml
H ₂ O	5,35ml
TEMED	10µl

3.7.3. Aplicação da amostra e eletroforese

As amostras de extratos contendo as proteínas denaturadas foram aplicadas no gel de empacotamento em espaços de 10mm. Os padrões de peso molecular (Pharmacia) utilizados nos géis foram: Fosforilase b de músculo de coelho (94kDa), Albumina de soro bovino (67kDa), Ovoalbumina da clara do ovo (43kDa), Anidrase

carbônica de eritrócitos bovinos (30kDa), Inibidor de tripsina da soja (20,1kDa) e β -Lactalbumina de leite bovino (14,4kDa). Aproximadamente 100ug de cada uma das proteínas relacionadas acima foram dissolvidas em 100ul de tampão da amostra e fervidas por 5 min. a seguir, aliquotas de 3ul foram colocadas nos géis com auxílio de uma micropipeta (Drummond).

O tampão do reservatório consistiu de:

Tris-HCl pH 8,3 (0,025M)	3,0g/l
Glicina (0,192M)	14,4g/l
SDS 20%	5,0 ml
H ₂ O	qsp 500 ml

A eletroforese foi desenvolvida a 25mA por 40 minutos ou até a frente de bromofenol alcançar o gel de corrida. Em seguida, a amperagem foi aumentada para 40mA e a eletroforese foi desenvolvida até que a frente de bromofenol atingisse o final do gel. A seguir o gel foi corado por pelo menos 2 horas com agitação moderada, utilizando-se um solução corante contendo: Metanol (50%), Coomassie Blue (25 μ g/l) e ácido acético glacial (92ml). Em seguida o gel foi então descorado com uma solução consistindo de metanol (300ml), ácido acético (70ml) e H₂O (630ml).

3.8. Regeneração de plantas

Amostras de calos embriogênicos friáveis das linhagens de milho Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1 submetidas ou não a seleção

para tolerância ao herbicida glifosato, foram transferidos para meio de regeneração (MR) contendo sais N6 ou MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), tiamina-HCl (15µM), ácido nicotínico (7,5µM), piridoxina (7,5µM), inositol (550µM), gelrite (2,4g/l) e suplementado com sacarose (6%) e cinetina (10µM).

As culturas foram mantidas em câmara de crescimento ajustada para 14 horas de luz ($125 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) e temperatura de $28 \pm 1^\circ C$. Subculturas foram realizadas a cada 15 dias. Plântulas regeneradas foram transferidas individualmente ou em pequenos grupos para frascos de vidro contendo meio de crescimento consistindo de metade da concentração de sais MS, tiamina-HCl (15µM), ácido nicotínico (7,5µM), piridoxina (7,5µM), sacarose (2%) e gelrite (2,4g/l). Após 10-20 dias em meio de crescimento, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos (500ml) contendo vermiculita, regadas com solução de Hoagland e mantidas em condições de alta umidade por 7 dias. A seguir, as plântulas que sobreviveram a esta adaptação ao meio ambiente foram transferidas para o campo.

3.8.1. Teste de regeneração para a linhagem TuxMo-1

Amostras de calos controle e tolerantes da linhagem TuxMo-1, após a sexta subcultura de seleção, foram utilizadas em quatro testes de regeneração.

(a). Utilizando-se os seguintes tratamentos de

meio de cultura MR contendo sais MS, vitaminas e diferentes concentrações de sacarose, cinetina e 6-BA foram testados:

sacarose	0	10 μ Mcin	5 μ M6-BA	10 μ Mcin + 5 μ M6-BA
3%	MR-1	MR-2	MR-3	MR-4
6%	MR-5	MR-6	MR-7	MR-8

Os calos foram mantidos durante 30 dias nestes tratamentos e a seguir transferidos para meio MR contendo sacarose (3%) e suplementado com (1) 6-BA (5 μ M), (2) carvão ativado (0,5%), (3) carvão ativado (0,5%) e 6-BA (50 μ M). Após 15 dias, os calos foram transferidos para meio MR contendo sacarose (3%).

(b). Foram utilizados meios de cultura contendo sais N6, sacarose (6%) e carvão ativado (0,5%), nos seguintes tratamentos: (1) cinetina (100 μ M), (2) 6-BA (100 μ M), (3) cinetina (100 μ M) e 6-BA (100 μ M). Após um período de 15 dias nestes tratamentos, os calos foram transferidos para meio de cultura contendo sais MS, sacarose (6%) e mantidos durante 15 dias, e a seguir transferidos para meio MR, sacarose (3%), com e sem carvão ativado (0,5%).

(c). Inicialmente os calos foram submetidos a um tratamento em meio de cultura contendo sais N6, sacarose (3%), carvão ativado (0,5%) e 2,4-D (10 μ M) durante um período de 15 dias. A seguir, os calos foram transferidos para meio MR, sacarose (3%), com e sem carvão ativado (0,5%).

(d). Utilizou-se meio de cultura MR, suplementado com sacarose (3 e 6%) e cinetina nas concentrações de 0, 10, 20, 40, 80 e 160 μ M. Após 20 dias nesses tratamentos os calos foram transferidos para meio MR, contendo sacarose (3%).

Os experimentos de regeneração com a linhagem TuxMo-1 foram realizados em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento e 20 observações por parcela.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação da concentração subletal do glifosato em calos embriogênicos friáveis de milho

Para a determinação da concentração subletal de glifosato a ser utilizada na seleção, foi realizado um experimento adicionando-se ao meio de cultura um gradiente de concentração de glifosato variando de 0 a 2,4mM. Os calos das linhagens Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1 apresentaram comportamento diferencial frente ao gradiente de glifosato (Tabela 2). Uma melhor caracterização das diferenças de sensibilidade ao Roundup, entre as linhagens, pode ser observada ao expressar a redução do peso fresco em cada tratamento em relação ao controle (Figura 4).

Para início do processo de seleção foram estabelecidos limites de redução da taxa de crescimento entre 70-90%. Isto foi feito baseado em trabalhos já realizados onde em tabaco foi obtido 70% de inibição ao nível de 0,05mM de glifosato e em cenoura ocorria somente 10% de inibição nesta concentração (HADERLIE et al., 1977). Em milho foi observado que o crescimento das células da linhagem TuxMo-1 foi reduzido em 70% na presença de 0,3mM de Roundup, enquanto que a linhagem Cat100-1 apresentou uma redução de 83% ao nível de 0,6mM, e finalmente a linhagem Cat100-6 demonstrou uma redução de 90% no crescimento na concentração de 2,4mM do herbicida. Essas diferenças devem refletir as diferenças no "background" genético das

TABELA 2. Média de três repetições do peso fresco (crescimento) de calos embriogênicos friáveis das linhagens de milho Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1, avaliadas após 30 dias de cultura em meio contendo diferentes concentrações de glifosato.

Crescimento de calos (mg de peso fresco) linhagens			
glifosato (mM)	Cat100-1	Cat100-6	TuxMo-1
0	171,3	241,1	167,6
0,3	24,7	208,2	52,9
0,6	29,7	188,0	23,3
0,9	22,9	130,2	27,0
1,2	26,9	74,8	28,3
1,5	15,0	43,7	27,5
1,8	14,6	27,7	29,7
2,1	13,7	28,7	21,5
2,4	22,1	26,2	21,9

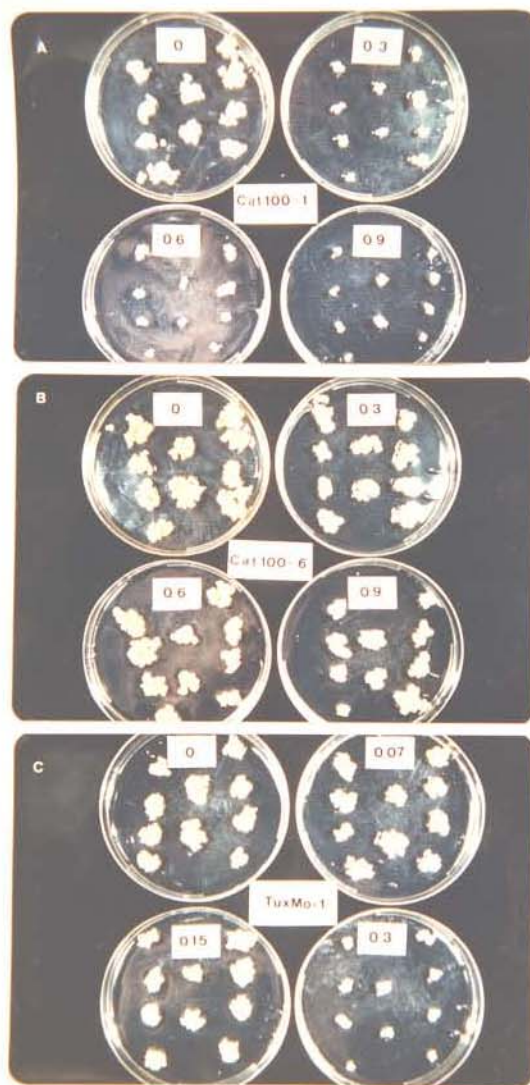


FIGURA 4. Calos embriogênicos friáveis de três linhagens de milho, Cat100-1 (A), Cat100-6 (B) e TuxMo-1 (C), submetidos ao tratamento em meio contendo diferentes concentrações do herbicida glifosato.

linhagens, uma vez que vieram de populações bastante distintas. Por outro, lado os resultados demonstram a existência de diferentes níveis de tolerância entre as linhagens de células (Tabela 2 e Figura 5). As linhagens e as concentrações de glifosato diferem entre si, quanto ao peso fresco de calos embriogênicos, o que é evidenciado pelos quadrados médios significativos (Tabela 3). A interação significativa indica que deve-se ter cautela nas comparações de linhagens de milho quanto à tolerância ao glifosato. Se confirmada esta tendência, as comparações entre linhagens só teriam validade quando efetuados dentro de cada concentração separadamente. Assim, a ordem das linhagens para tolerância poderia ser alterado ao longo do gradiente de concentração.

A linhagem TuxMo-1 apresentou a maior redução de crescimento em presença do herbicida, enquanto que a linhagem Cat100-1 teve comportamento intermediário e a linhagem Cat100-6 foi o genótipo que apresentou uma maior tolerância nos testes utilizados (Figura 5).

4.2. Seleção de calos embriogênicos friáveis ao glifosato comercial

Os calos das linhagens Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1 foram selecionados na concentração de 0,6, 2,4 e 0,3mM de glifosato respectivamente. De acordo com alguns trabalhos já realizados foi observado que para outras culturas a concentração de glifosato

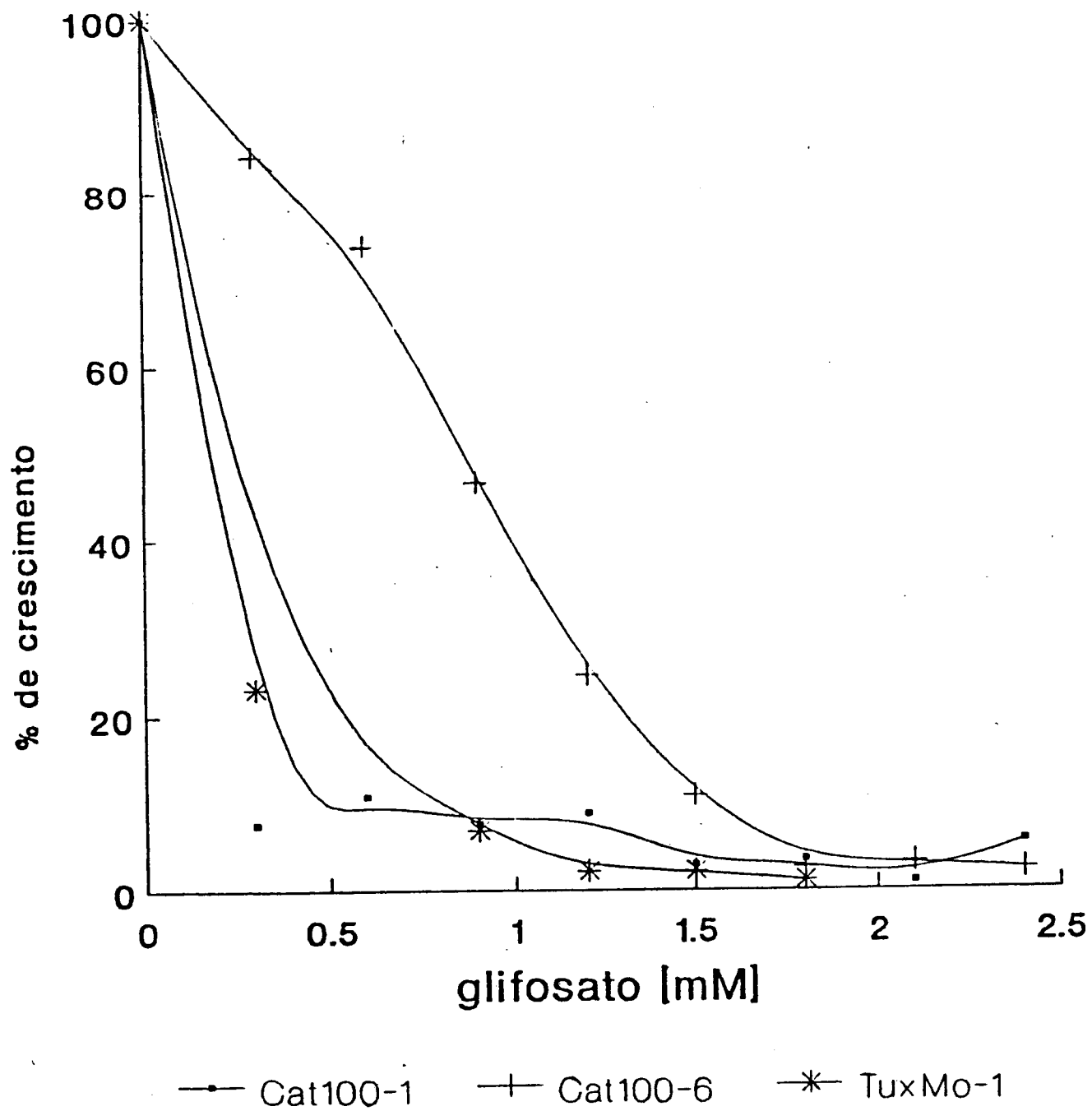


FIGURA 5. Calos embriogênicos friáveis das linhagens de milho Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1, submetidos à diferentes concentrações do herbicida glifosato.

TABELA 3. Análise de variância do peso fresco (crescimento) das linhagens de milho Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1, submetidos a diferentes concentrações de glifosato.

Fonte de Variação	Q.M.	G.L.	F
Linhagem (L)	38.667,16	2	122,15**
Concentração (C)	28.876,13	8	84,90**
L X C	4.193,62	16	13,25**
Resíduo	316,55	54	
Total	72.053,46	79	

** significativo ao nível de 1% ($0,001 < p < 0,01$)

utilizada para seleção foi de 0,25mM para células de cenoura (NAFZIGER et al., 1984), 0,50mM para células de **Corydalis sempervirens** (SMART et al., 1985), 3,0mM para tomate (SMITH et al., 1986) e 1,0mM para **Petunia hybrida** (STEINRUCKEN , 1986).

Foram realizadas 10 subculturas de calos friáveis na presença das dosagens subletais respectivas do herbicida. Na presença do herbicida, os calos suscetíveis apresentaram uma coloração esbranquiçada e com reduzido crescimento, já os tolerantes apresentaram uma coloração amarela e crescimento semelhante aos calos controle. Os controles consistiam de calos friáveis submetidos ao mesmo regime de subculturas na ausência do herbicida. Os calos selecionados, bem como os controles foram em seguida submetidos a uma série de 10 subculturas na ausência de glifosato. Em cultura de células de cenoura, NAFZIGER et al.(1984) realizou inicialmente 15 subculturas na presença de 25mM de glifosato e a seguir, 30 subculturas em meio sem herbicida.

Após o cultivo em meio sem glifosato os calos foram submetidos a um gradiente de concentração de glifosato variando de 0 a 4,8 mM, para verificar se o cultivo na ausência do glifosato afetava a resposta de tolerância. Este experimento foi realizado porque em alguns casos, a tolerância ao agente seletivo não é estável, sendo determinada por uma adaptação fisiológica e não por fatores genéticos.

As taxas de crescimento dos calos selecionados e controles apresentaram diferenças entre as linhagens Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1 (Figuras 6, 7 e 8). Os calos selecionados e

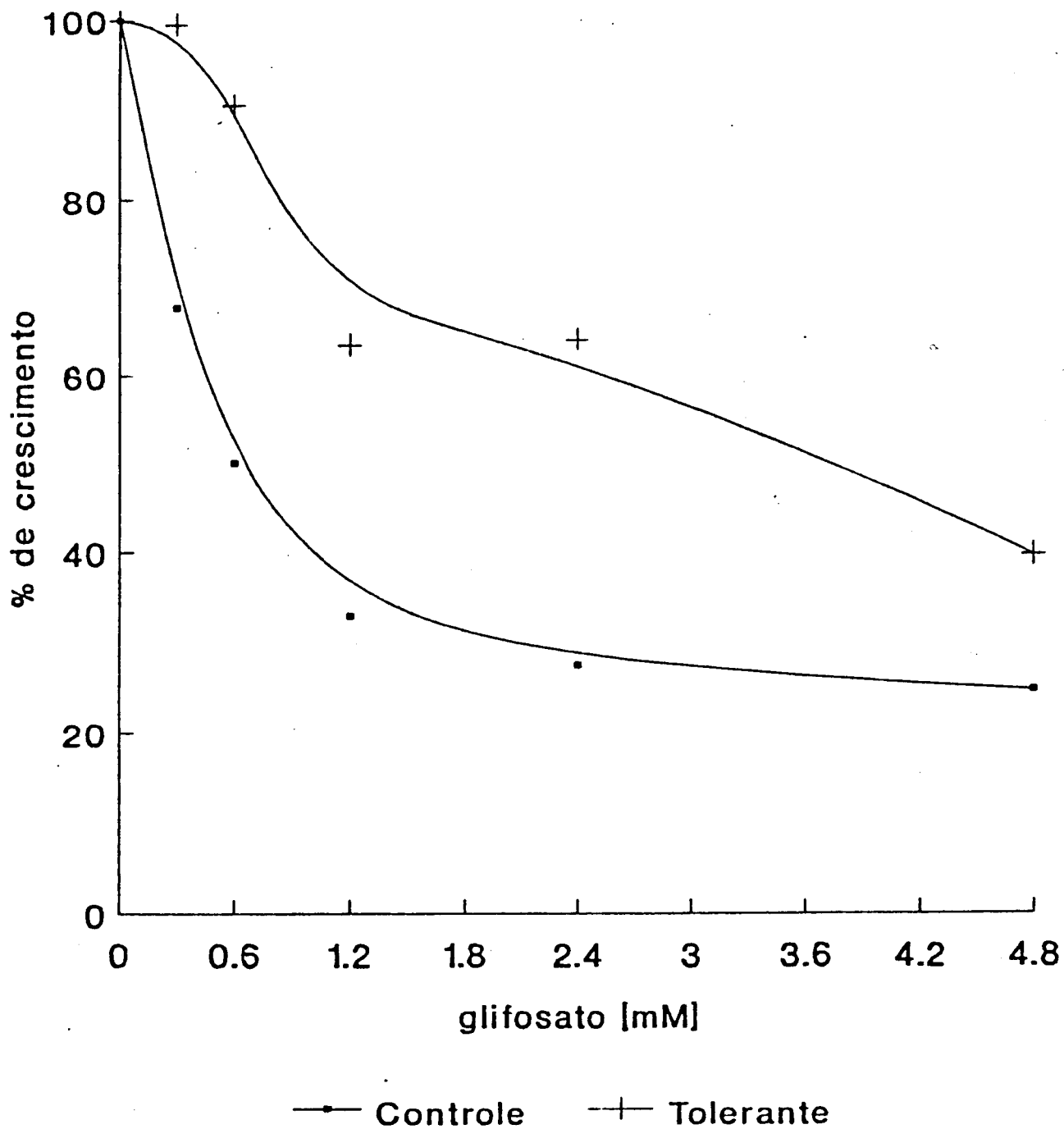


FIGURA 6. Taxa de crescimento (% do controle) de calos embriogênicos friáveis de milho da linhagem Cat100-1, avaliada após 30 dias de cultura em meio contendo diferentes concentrações do herbicida glifosato.

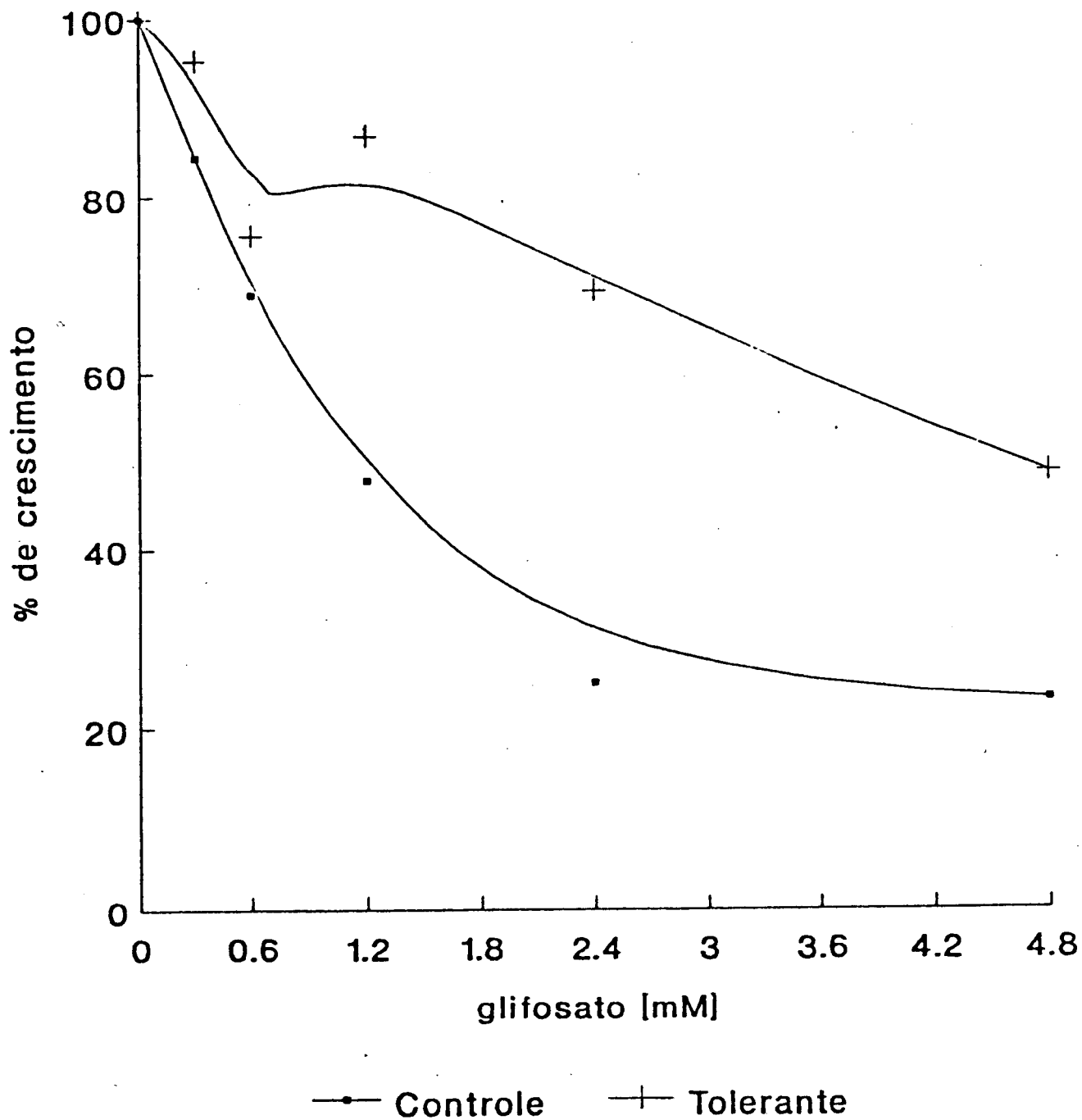


FIGURA 7. Taxa de crescimento (% do controle) de calos embriogênicos friáveis de milho da linhagem Cat100-6, avaliada após 30 dias de cultura em meio contendo diferentes concentrações do herbicida glifosato.

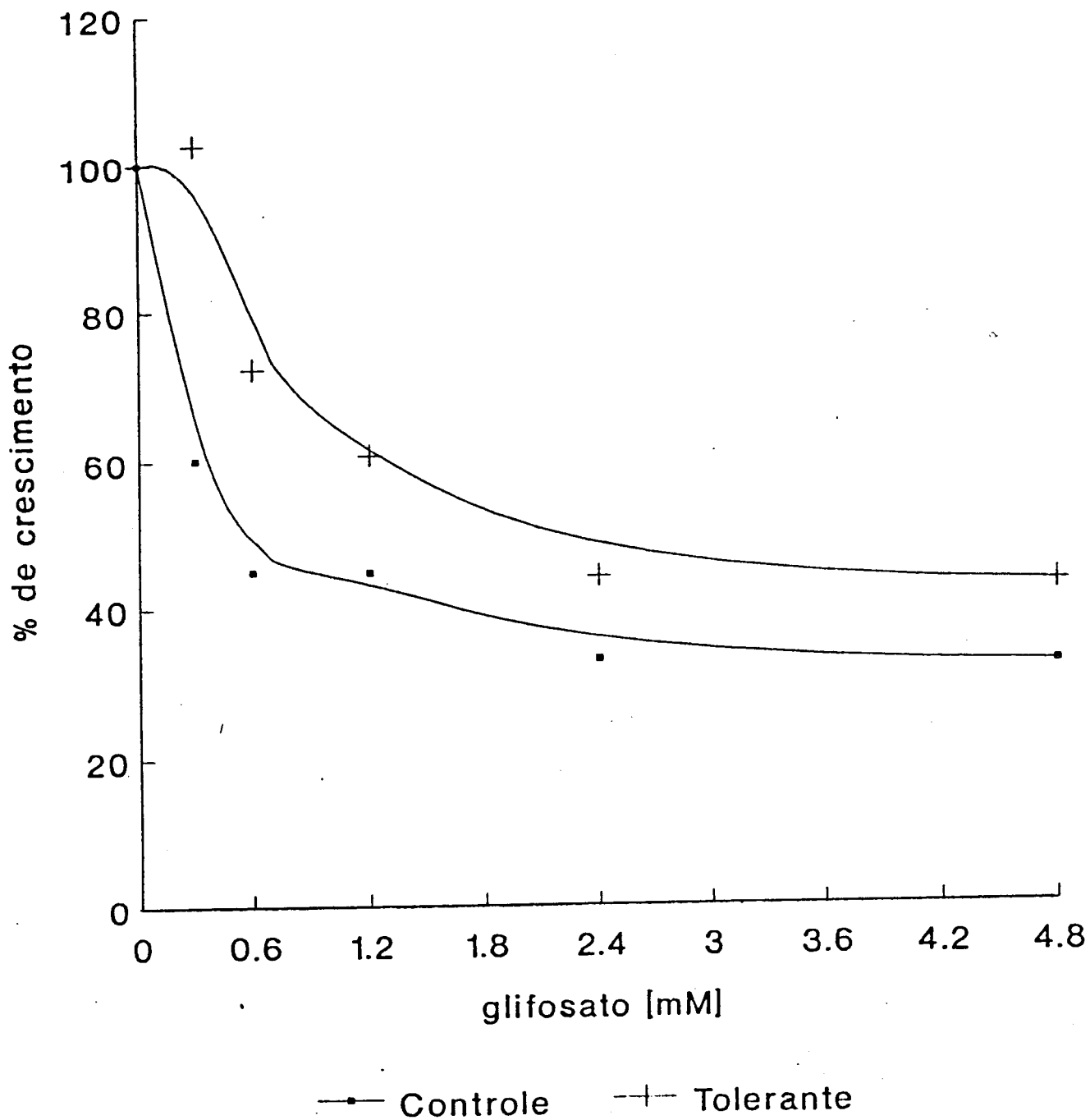


Figura 8. Taxa de crescimento (% do controle) de calos embriogênicos friáveis de milho da linhagem TuxMo-1, avaliada após 30 dias de cultura em meio contendo diferentes concentrações do herbicida glifosato.

controles para cada linhagem apresentaram diferenças com respeito à proporção de diminuição na taxa de crescimento (Tabela 4), onde foi possível detectar através da análise de variância diferenças significativas ao nível de 1% em comparação das diferentes doses utilizadas e entre os calos controles e tolerantes de cada linhagem. O quadrado médio significativo para calos controles e tolerantes (Tabela 5) indica a eficiência do método da utilizado e a resposta efetiva à seleção.

A subpopulação de células da linhagem Cat100-1 selecionada na presença do herbicida, apresentou uma maior crescimento nos níveis de 0,3 e 0,6mM de glifosato, o que corresponde respectivamente a 32 e 40% em relação ao controle. Uma inibição de 50% do crescimento para a subpopulação tolerante foi obtida com 3,33mM de glifosato, ou seja, 5,64X a concentração que inibe na mesma proporção os calos controle (Figura 6).

A subpopulação de células da linhagem Cat100-6 selecionada apresentou um crescimento de 11 e 39% superior em relação ao controle nos níveis de 0,3 e 1,2mM de glifosato respectivamente. A subpopulação tolerante desta linhagem apresentou 50% de inibição no crescimento na presença de 3,87mM de glifosato, o que representa uma diferença de 3,36X maior em relação à inibição de 50% dos calos controles (Figura 7).

Os calos tolerantes da linhagem TuxMo-1 tiveram 50% de inibição no crescimento na presença de 2,13mM de glifosato, o que representa uma diferença de 1,19X maior do que o nível para 50% de inibição dos calos controles (Figura 8).

TABELA 4. Média do peso fresco de calos embriogênicos friáveis das linhagens de milho Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1, avaliada após 30 dias de cultura em meio contendo diferentes concentrações de glifosato. Os dados da tabela foram transformados em ângulo pela fórmula $X = \arcsen \sqrt{p}$.

glifosato (mM)	Cat100-1		Cat100-6		TuxMo-1	
	C	T	C	T	C	T
0,3	55,37	86,37	66,81	77,61	50,77	90,00
0,6	45,06	71,85	55,98	60,40	41,96	58,05
1.2	35,06	52,89	43,74	68,78	41,90	51,18
2.4	31,63	53,19	29,93	56,17	35,06	41,50
4.8	29,80	39,00	28,73	44,20	34,57	40,86

C-calos não selecionados (controle)

T-calos selecionados para tolerância ao glifosato

TABELA 5. Análise de variância da taxa de crescimento de calos controles e tolerantes ao glifosato de três linhagens de milho, avaliadas após 30 dias de cultura em meio contendo diferentes concentrações de glifosato. O experimento foi realizado no delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições como dados transformados em $\arcsen\sqrt{p}$.

Fonte de Variação	Q.M.	G.L.	F
Linhagem (L)	56,6847	2	0,9412 N.S.
Concentração (C)	1117,2781	4	18,5507 **
Contr/Tol (CT)	2352,8621	1	39,0658 **
L X C	23,565	8	0,3913 N.S.
L X CT	24,3547	2	0,4044 N.S.
C X CT	54,4209	4	0,9036 N.S.
L X C X CT	60,2252	8	
TOTAL	7872,0875	29	

N.S. - Não significativo

** - significativo ao nível de 1% ($0,001 < p < 0,01$)

Com os resultados obtidos, podemos observar que as linhagens Cat100-1, Cat100-6 (Figura 9) e TuxMo-1 apresentaram um ganho de seleção significativo em relação aos respectivos controles (Tabela 5).

4.3. Efeito do glifosato puro

Um gradiente de 0, 0,25, 0,50, 0,75 e 1,0 mM de glifosato puro foi testado em calos tolerantes e controles das linhagens de milho Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1. Foi observado que o glifosato puro foi mais ativo na inibição do crescimento dos calos controles. Na linhagem TuxMo-1, 50% de inibição foi obtida com 0,5mM usando o produto puro, enquanto que com o produto comercial o mesmo nível de inibição foi atingido com 0,6mM do princípio ativo. Na linhagem Cat100-1, 0,50mM do produto puro causou 50% de inibição em contraste com 0,6mM do produto comercial (Tabela 6). Estes resultados mostram a similaridade das respostas de calos submetidos ao tratamento com glifosato puro e comercial (tabela 2 e 6). Devido ao uso de baixas concentrações de glifosato puro nos calos tolerantes, observa-se que não houve diferenças no crescimento entre os tratamentos utilizados.

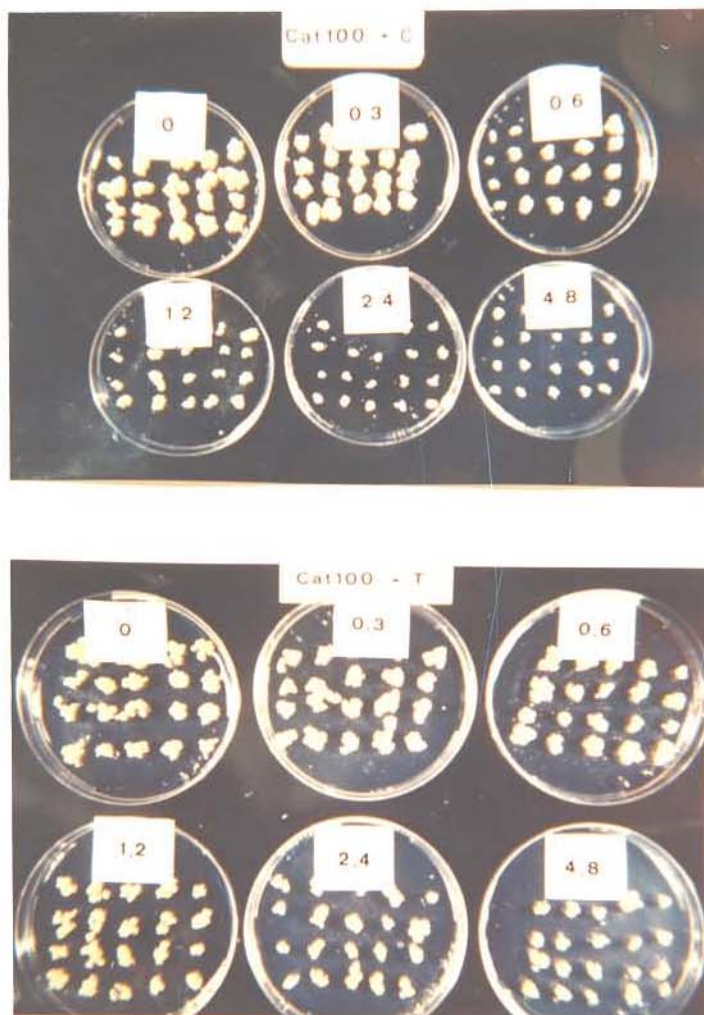


FIGURA 9. Calos controles (C) e tolerantes (T) da linhagem de milho Cat100-6, submetidos a um tratamento em meio contendo diferentes concentrações do herbicida glifosato.

TABELA 6. Média do peso fresco (crescimento) de calos das linhagens de milho Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1, após 30 dias de cultura em meio contendo diferentes concentrações de glifosato puro (98,9%). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições e 20 observações por parcela.

Taxa de crescimento (mg de peso fresco) linhagens						
Glifosato [mM]	Cat100-1		Cat100-6		TuxMo-1	
	C	T	C	T	C	T
0,0	112,90	67,50	126,80	71,20	89,20	69,20
0,25	68,80	72,00	115,60	71,10	55,80	74,00
0,50	49,33	70,10	132,60	82,50	44,50	81,10
0,75	46,44	70,10	109,90	81,40	44,20	61,80
1,00	43,88	81,30	126,60	82,50	48,00	59,70

C-calos não selecionados (controles)

T-calos selecionados para tolerância ao glifosato

4.4. Tolerância de plântulas ao herbicida glifosato

De acordo com o trabalho desenvolvido por Rubin et al. (1982), onde plântulas de *Vigna radiata* L. foram submetidas a um tratamento com diferentes concentrações de glifosato e foi observado que ocorria uma redução de 50% no peso fresco de raiz ao nível de 25uM do herbicida, realizou-se testes similares utilizando-se plântulas de milho.

Como foram encontradas diferenças significativas na resposta das células frente a diferentes concentrações de glifosato, entre as três linhagens, foi feito um experimento para verificar se essas diferenças ocorrem também nas plantas de cada linhagem. Para isso, plântulas das três linhagens foram cultivadas em solução nutritiva contendo diferentes concentrações do herbicida glifosato variando de 0 a 0,12 mM de. Foram utilizadas concentrações 10X menores que aquelas utilizadas para calos, uma vez que estes são muito menos afetados pelo herbicida do que as plântulas.

As plântulas foram desenvolvidas por 7 dias nas soluções e o crescimento determinado pela medida do comprimento da radícula e peso seco das raízes e partes aéreas. As plântulas das três linhagens de milho apresentaram reações distintas na presença do herbicida.

Considerando-se todos os parâmetros avaliados, comprimento da radícula (Figura 10), peso seco da raiz (Figura 11)

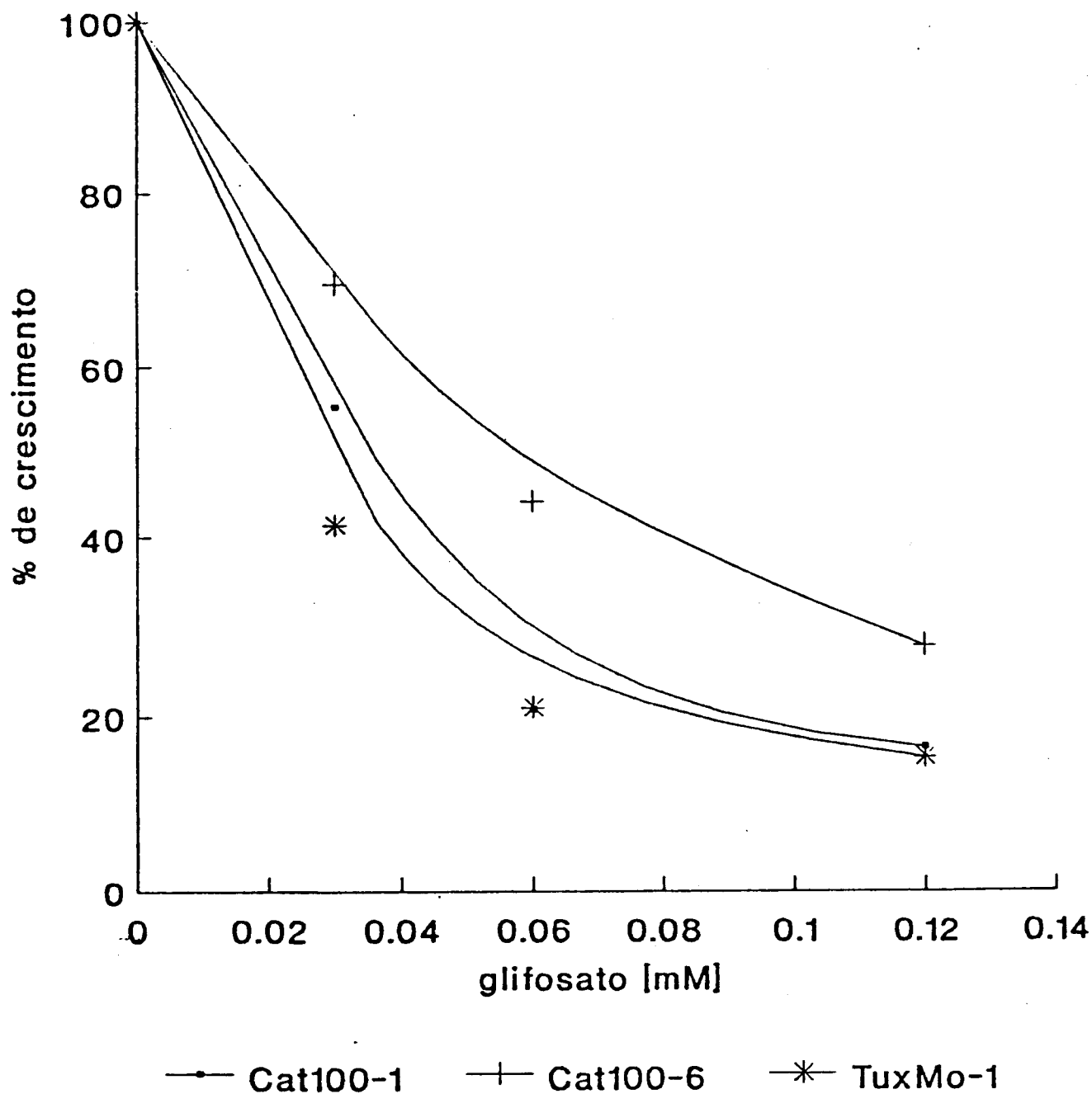


FIGURA 10. Taxa de crescimento (% do controle) das radículas de plântulas das linhagens de milho Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1, submetidas a diferentes concentrações de glifosato em solução nutritiva. A avaliação foi realizada após 7 dias de tratamento.

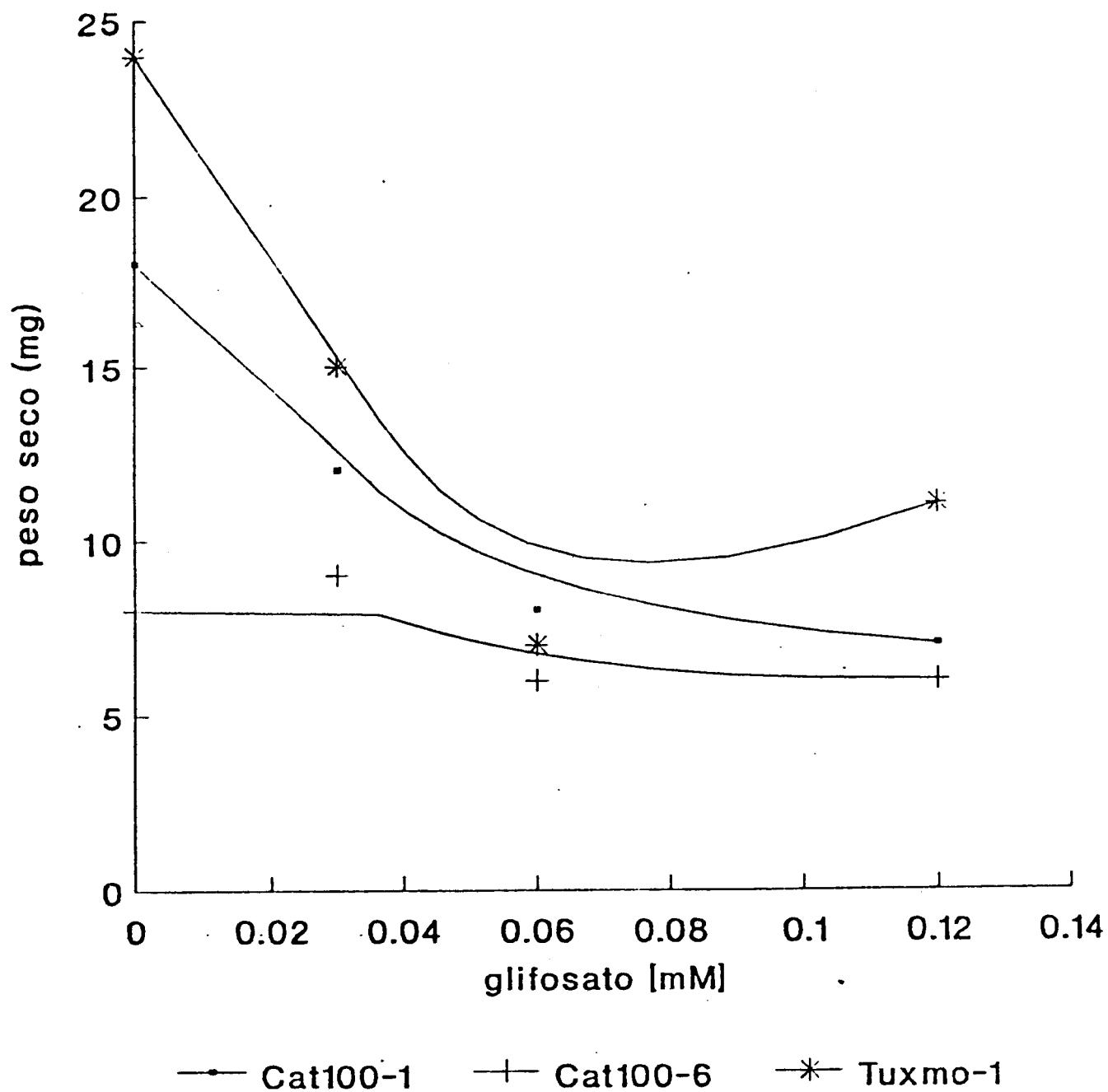


FIGURA 11. Peso seco da raiz das linhagens de milho Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1, desenvolvidas em solução nutritiva contendo diferentes concentrações de glifosato.

e peso seco da parte aérea (Figura 12), podemos verificar que a linhagem Cat100-6 foi mais tolerante ao herbicida glifosato do que as linhagens Cat100-1 e TuxMo-1 que apresentaram comportamento semelhantes. Isso sugere uma base genética para as diferenças encontradas entre as linhagens. Do mesmo modo que para o peso fresco de calo (Tabela 3), existe interação significativa entre linhagem x concentração de glifosato quando avaliado o comprimento da radícula (Tabela 7), sugerindo que comparações entre linhagens devem ser feitas dentro de cada concentração separadamente.

Para comprimento de raiz, a linhagem Cat100-6 sofreu uma redução de aproximadamente 70% na presença de 0,12mM de glifosato, enquanto que as linhagens Cat100-1 e TuxMo-1 apresentaram uma diminuição de cerca de 85% nas mesmas condições de seleção. Na presença de 0,12mM do herbicida, a linhagem Cat100-6 teve uma redução de 30% de peso seco de raiz em relação ao controle, enquanto que a linhagem Cat100-1 reduziu em 60% e a linhagem TuxMo-1 em 50% (Tabela 8). Respostas similares foram observadas em relação ao peso seco da parte aérea, onde a linhagem Cat100-6 teve uma redução de somente 30% na presença de 0,12mM de glifosato, em contraste com cerca de 60% de redução para as outras duas linhagens.

É importante verificar que os dois sistemas são capazes de discriminar genótipos quanto à suscetibilidade/tolerância ao glifosato (Tabela 3, 5 e 7). Em ambos os sistemas foram detectadas diferenças significativas entre as linhagens, com a tendência da linhagem Cat100-6 ser mais tolerante ao herbicida glifosato nos gradientes e parâmetros utilizados (Figura 5, 10, 11 e 12; Tabela 2 e 8).

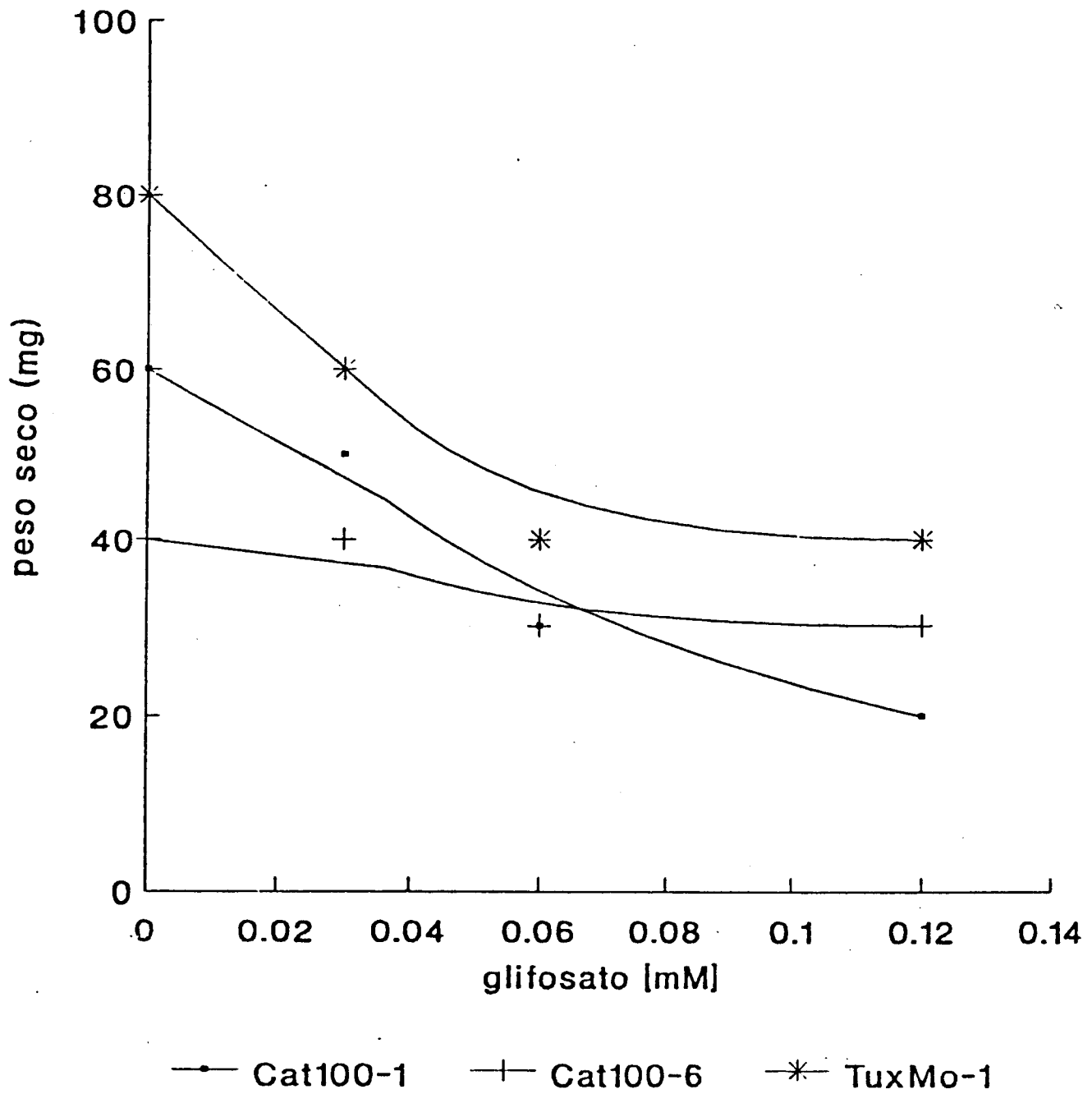


FIGURA 12. Peso seco da parte aérea de plântulas das linhagens de milho Cat100-, Cat100-6 e TuxMo-1, desenvolvidas em solução nutritiva contendo diferentes concentrações de glifosato.

TABELA 7. Análise de variância do comprimento da radícula de plântulas das linhagens de milho Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1, desenvolvidas em solução nutritiva contendo diferentes concentrações de glifosato. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 15 repetições por tratamento para cada linhagem.

Fonte de Variação	Q.M.	G.L.	F
Linhagem (L)	224,20	2	24,02**
Concentração (C)	2277,15	3	243,99**
L X C	135,56	6	14,52**
Resíduo	9,33	168	
Total	2646,24	179	

** - significativo ao nível de 1% ($0,001 < p < 0,01$)

TABELA 8. Médias do comprimento da radícula de plântulas das linhagens de milho Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1, desenvolvidas em solução nutritiva contendo diferentes concentrações de glifosato, após 7 dias de tratameto.

Comprimento da radícula (cm)			
linhagens			
glifosato (mM)	Cat100-1	Cat100-6	TuxMo-1
0	24.92	11.78	21.87
0.03	13.79	8.18	9.06
0.06	5.16	5.21	4.59
0.12	4.09	3.27	3.34

4.5. Absorção de glifosato ^{14}C em calos embriogênicos friáveis

Um dos mecanismos de tolerância a um dado herbicida pode ser devido a uma resposta diferencial na absorção do mesmo.

De acordo com NAFZIGER et al. (1984) foi observado que em culturas de células de cenoura, a absorção foi rápida e linear durante as primeiras horas de transferência em meio contendo glifosato ^{14}C e não houve diferença na cinética de absorção entre as células selecionadas e não selecionadas. Resultados semelhantes foram obtidos por HADERLIE et al. (1977).

Testes de absorção de glifosato ^{14}C nas subpopulações de calos tolerantes e controles de cada linhagem foram realizados para estudar possíveis alterações no mecanismo de absorção do herbicida. Foi utilizado 0,25mM de glifosato ^{14}C durante 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 4,0 horas.

Como pode ser visto nas Figuras 13, 14 e 15, o glifosato foi absorvido rapidamente após uma hora de incubação em meio contendo glifosato ^{14}C , atingindo um pico a 1,5 horas e em seguida a concentração diminui. Esse comportamento foi observado para todos os materiais.

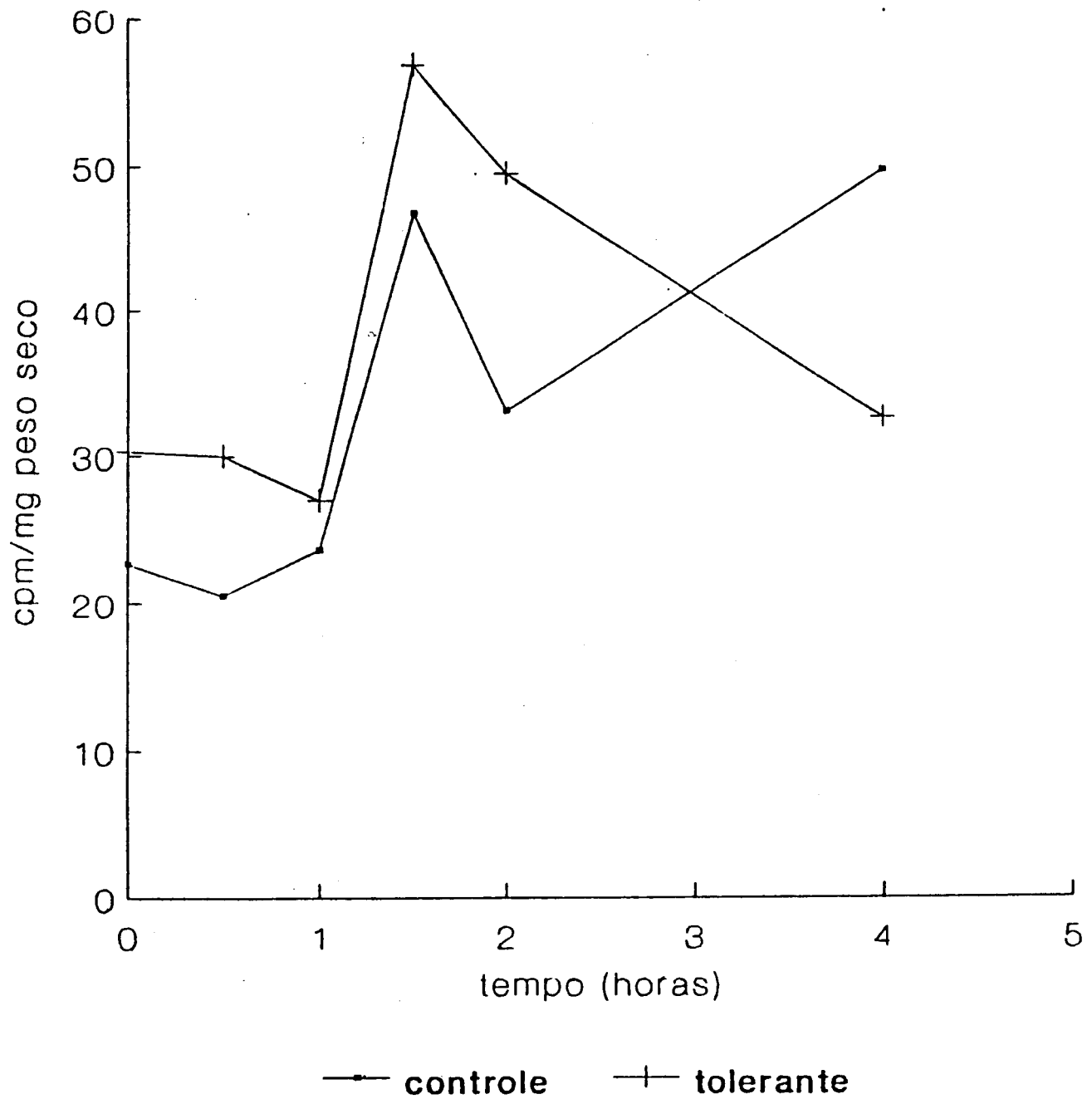


FIGURA 13. Absorção de glifosato-¹⁴C em calos tolerantes e controles da linhagem de milho Cat100-1.

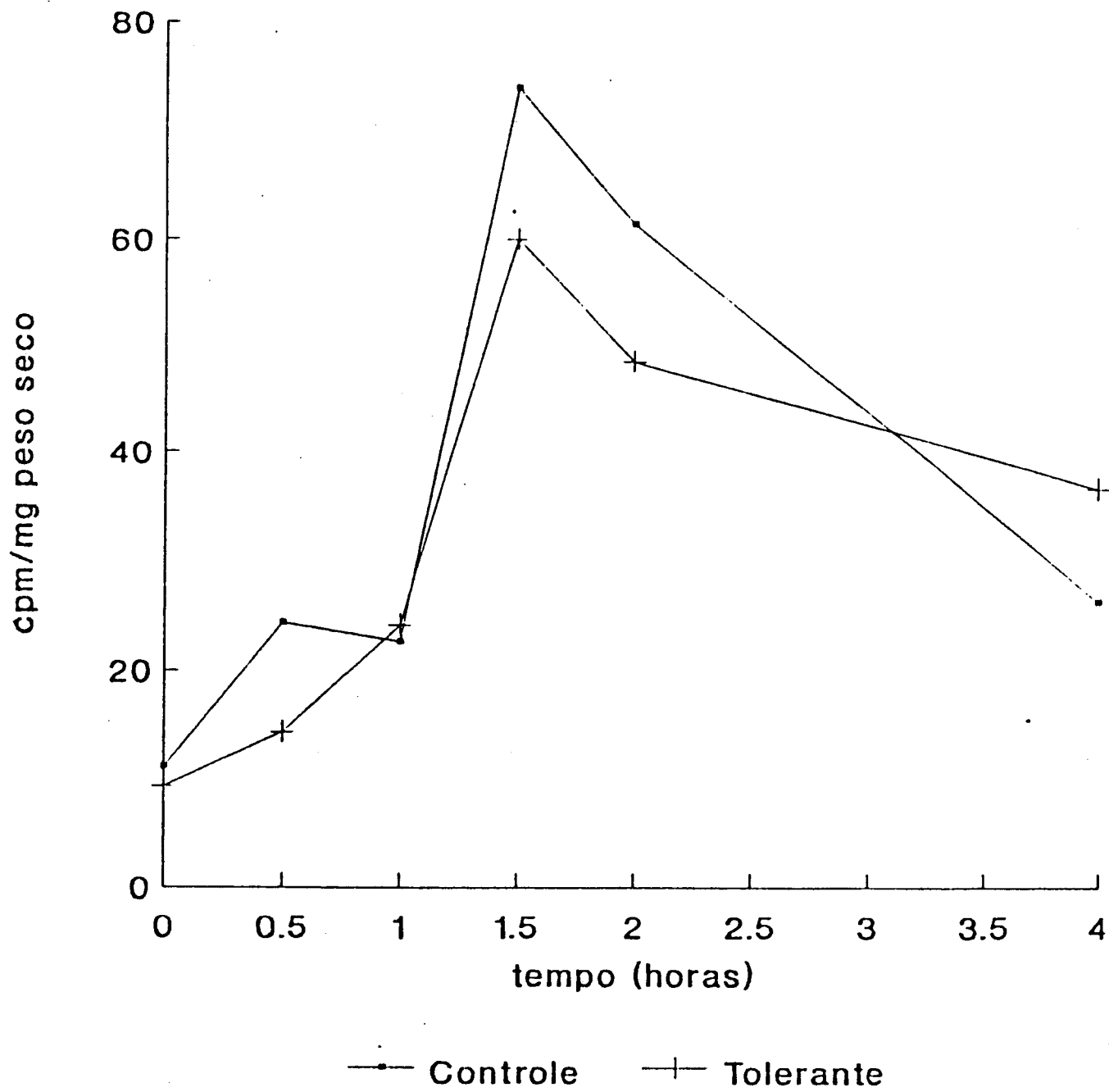


FIGURA 14. Absorção de glifosato-¹⁴C em calos tolerantes e controles da linhagem de milho Cat100-6.

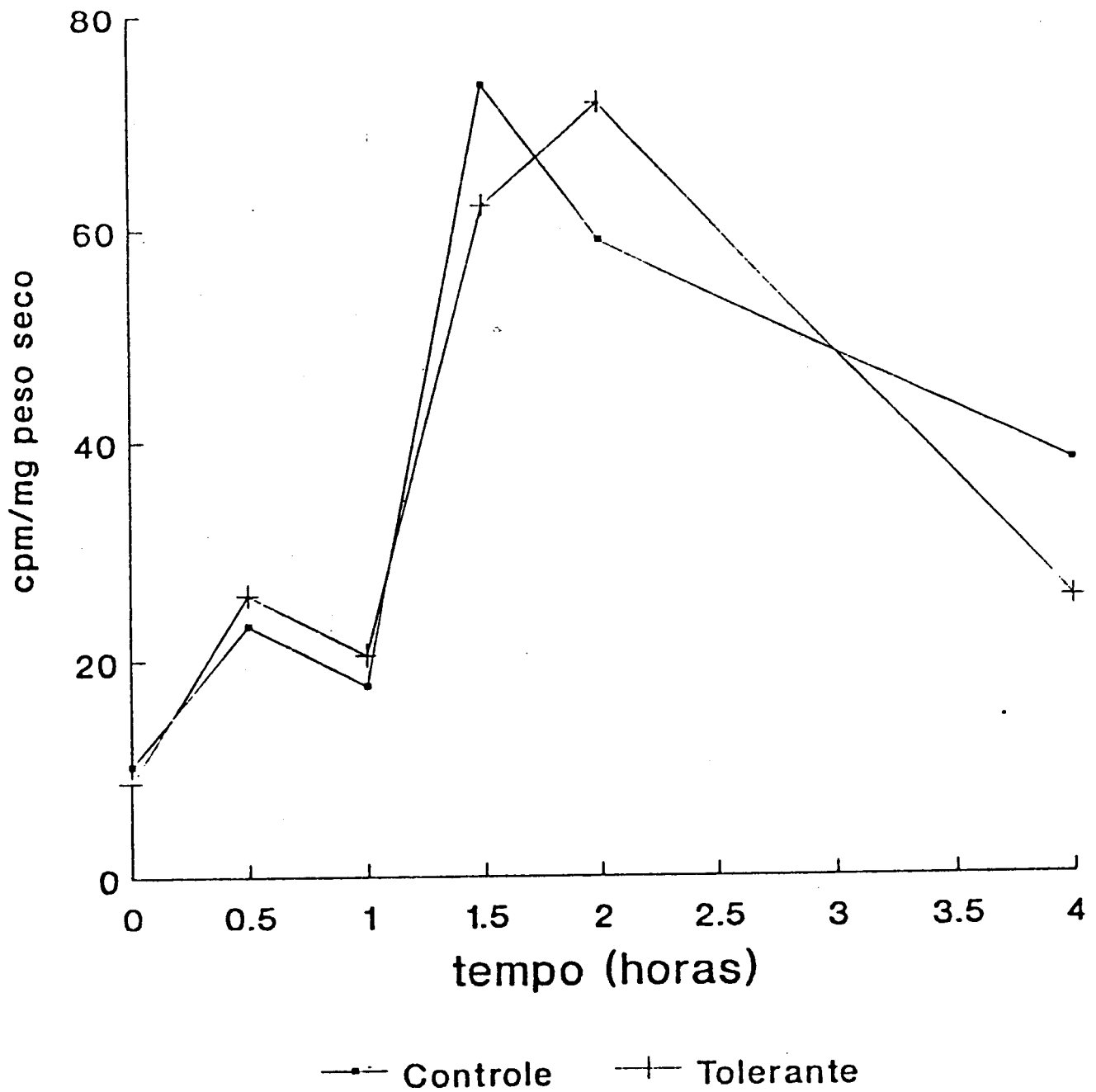


FIGURA 15. Absorção de glifosato-¹⁴C em calos tolerantes e controles da linhagem de milho Tuxmo-1.

A análise comparativa entre as linhagens não demonstrou diferença significativa na absorção entre as subpopulações tolerantes e controle (Tabela 9). Estes resultados sugerem que não houve alteração no mecanismo de absorção entre as subpopulações selecionadas nas linhagens Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1 e as diferenças de crescimento entre as subpopulações tolerantes e controles possivelmente não são devido a barreiras de absorção e sim a outros fatores.

4.6. Determinação da atividade da enzima 5-enolpiruvil shi- quimato 3-fosfato sintetase (EPSPs)

Evidências de que a EPSPs é o alvo principal do glifosato em bactérias tem colaborado para algumas observações, tais como, em **Escheria coli** a amplificação do gene clonado para EPSPs, aumenta a tolerância ao glifosato (DUNCAN et al., 1983). Em **Salmonella typhimurium** (COMAI et al., 1983) e **Aerobacter aerogenes** (SCHULZ et al., 1984), tem sido demonstrada ser devido a mudanças na estrutura da EPSPs, resultando dessa forma em uma redução na capacidade de se ligar ao glifosato. Em células de plantas os dados são mais controvertidos, onde a enzima EPSPs parece ser o alvo principal do herbicida e está de acordo com observações realizadas com culturas de células tolerantes ao glifosato de **Corydalis sempervirens** (AMRHEIN et al., 1983) e **Daucus carota** (NAFZIGER et al., 1984), onde foi observado um aumento de 10 a 30X nos níveis de atividade da enzima EPSPs. STEINRUCKEN et al. (1986) em análise da

cultura de células de **Petunia hybrida** resistente a 1mM de glifosato revelaram um aumento de 15 a 20X o nível da EPSPs.

A atividade da enzima EPSPs foi determinada para as subpopulações tolerantes e controles das três linhagens de milho através de duas metodologias.

Pelo método de liberação de Pi não houve diferenças significativas entre os calos tolerantes e controles nas três linhagens estudadas, provavelmente esta metodologia não seja adequada para detectar pequenas diferenças entre os materiais analisados.

Utilizando o método de HPLC, foi observado uma diferença da atividade específica de 2,08X para a subpopulação tolerante da linhagem Cat100-6. Nos calos tolerantes da linhagem TuxMo-1 foi detectado um aumento da atividade específica da enzima de 1,4X em relação ao controle. Não foi observado diferença na atividade da enzima EPSPs para os calos tolerantes e controles da linhagem Cat100-1 (Tabela 10).

A atividade específica da EPSPs nos calos tolerantes e controles da linhagem Cat100-6 foi estudada dentro de um gradiente de glifosato comercial (0, 0,3, 0,6 e 2,4 mM). Uma alteração da atividade específica proporcional à concentração de glifosato tem sido utilizada para demonstrar a sensibilidade da EPSPs ao glifosato. Não houve alteração da atividade para ambas as subpopulações (tolerantes e controles) o que sugere uma possível alteração na estrutura química da enzima EPSPs neste genótipo, conferindo uma menor sensibilidade a este herbicida (Tabela 11).

TABELA 10. Atividade específica da enzima 5-enolpiruvil shiquimato 3-fosfato sintetase (EPSPs) através do método HPLC. A enzima foi extraída controle e tolerantes ao glifosato, das linhagens de milho Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1, na ausência do herbicida.

nmol de EPSP/min./mg proteína			
Linhagens	Tolerante	Controle	Tol./Contr.
Cat100-1	10,9	11,4	0,96
Cat100-6	10,8	5,2	2,08
TuxMo-1	11,2	8,0	1,40

TABELA 11. Atividade específica da enzima 5-enolpiruvil shiquimato sintetase (EPSPs) através do método de HPLC. A enzima foi extraída de calos tolerantes e controles da linhagem de milho Cat100-6. Os calos foram mantidos durante 30 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de glifosato.

glifosato (mM)	nmol de EPSP/min./mg proteína	
	Controle	Tolerante
0,0	5,18	10,80
0,3	5,61	9,66
0,6	5,39	8,62
2,4	5,84	9,70

A diferença da atividade específica encontrada entre as subpopulações tolerantes e controles nas linhagens Cat100-6 e TuxMo-1 foram baixas, porém persistentes, após 10 subculturas em meio seletivo seguido de 10 subculturas em meio não seletivo.

A linhagem Cat100-1, sob o mesmo regime de subcultura, não apresentou diferença após pressão de seleção entre os calos tolerantes e controle. Estes resultados são consistentes com a análise da atividade específica da enzima EPSPs que não apresentou diferença entre estas duas subpopulações.

AMRHEIN et al. (1987) propõem dois mecanismos que são particularmente informativos quanto às reações de tolerância ao glifosato; (1) insensibilidade da enzima-alvo (EPSPs) ao herbicida glifosato devido a uma mutação ou (2) superprodução da enzima-alvo. Já de acordo com STEINRUCKEN (1986) a tolerância ao glifosato pode ser devido a: (1) superprodução da enzima EPSPs; (2) alteração da estrutura da enzima, resultando em uma forma resistente; (3) alteração do alvo da EPSPs, ou seja, alteração da permeabilidade, metabolismo do herbicida ou aumento do substrato (PEP).

As reações de tolerância ao glifosato nas linhagens em estudo poderiam ter as seguintes interpretações: (1) Alteração da permeabilidade de membrana ao glifosato, (2) Aumento da concentração da enzima EPSPs, (3) Aumento da concentração dos substratos da enzima EPSPs, (4) Alteração da estrutura da enzima EPSPs.

Os testes de absorção de glifosato ^{14}C não mostraram nenhuma diferença entre as subpopulações tolerantes e controles nas

três linhagens, sugerindo que a reação de tolerância não seja devida a absorção diferencial de glifosato.

Os calos tolerantes e controle da linhagem Cat100-6 e TuxMo-1 apresentaram pequeno aumento da atividade específica da enzima EPSPs em relação aos calos controle, sendo possível interpretar as reações de tolerância nestas duas linhagens, pelo aumento dos substratos da enzima EPSPs (SSP e PEP).

Uma outra interpretação seria a alteração da estrutura da enzima EPSPs tornando-a menos sensível a presença do glifosato. Esta possibilidade foi testada com a linhagem Cat100-6 na faixa de concentração 0,3 a 2,4 mM de glifosato comercial. A atividade específica da enzima EPSPs não foi reduzida, o que sugere uma menor sensibilidade da EPSPs da linhagem Cat100-6 para o glifosato nas concentrações testadas.

Em realidade, a reação de tolerância ao glifosato das linhagens estudadas poderia ser consequência de várias alterações simultâneas, tais como: aumento da concentração da enzima, aumento dos substratos, e alteração da estrutura química da enzima.

4.7. Eletroforese de proteína total

O herbicida glifosato é um potente inibidor da enzima

5-enolpiruvil shiquimato 3-fosfato sintetase (EPSPs) em plantas superiores. O glifosato interfere com o crescimento das plantas, uma vez que através da inibição da enzima EPSPs ocorre uma alteração na biossíntese dos aminoácidos aromáticos. Foi demonstrado que a amplificação do gene da EPSPs e conseqüentemente uma superprodução da enzima e, células de **Petunia** resultava em plantas tolerantes ao glifosato (SHAH et al., 1986).

Com o intuito de se verificar possíveis alterações em polipetídeos da ação do glifosato na EPSPs, a proteína total das três linhagens de milho Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1 foi extraída de calos mantidos em meio contendo diferentes concentrações de glifosato puro (0, 0,25, 0,50, 0,75mM). A proteína total dos calos foi submetida a análise eletroforética em géis de gradiente de 5-20% de poliacrilamida contendo SDS. Como pode ser visto na Figura 16, um complexo padrão de bandas foi observado para as proteínas das três linhagens utilizadas, indicando a presença de múltiplos polipeptídeos de pesos moleculares aparentes distintos. As bandas das proteínas nos géis de SDS-PAGE se agruparam principalmente entre 94 e 14 kDa. Existe indícios de bandas protéicas com peso molecular aparente maior que 94kDa contudo, a intensidade destas bandas no gel é fraca.

Não foi detectado nenhum tipo de alteração no padrão SDS-PAGE das proteínas em nenhuma das linhagens. O fato da atividade da enzima EPSPs detectada em calos tolerantes ser levemente maior que nos controle, indica que as mudanças ocorridas devem ser pequenas. Portanto, o fato de nenhuma modificação ter sido observada nos géis de poliacrilamida pode indicar simplesmente que este método de análise protéica não é sensível o suficiente para detecção

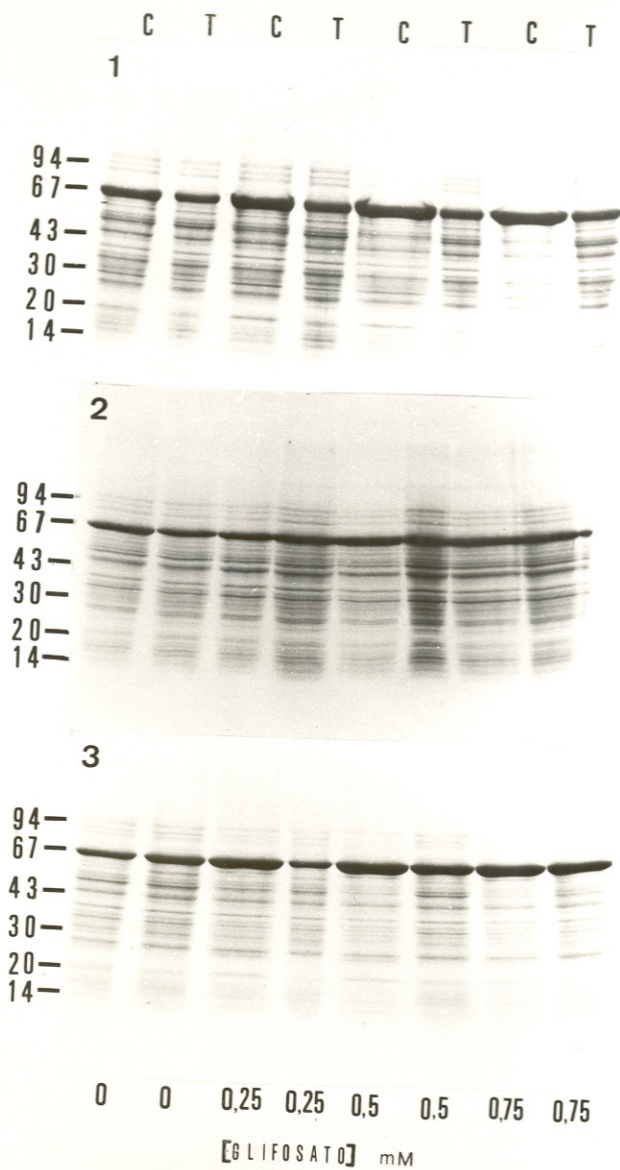


FIGURA 16. Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida. (C) representa amostra de calos controles e (T) representa amostra de calos tolerantes das linhagens de milho Cat100-1 (1), Cat100-6 (2) e TuxMo-1 (3).

de possíveis alterações. Para comprovação adequada de possíveis alterações nos polipeptídeos, métodos de análise protéica mais sensíveis como focalização isoeletrica ou análises imunológicas das proteínas teriam que ser empregados.

4.8. Regeneração de plantas

Calos tolerantes e controle das três linhagens foram submetidos a testes de regeneração. Utilizando-se meio MR, baixa frequência de plântulas foram recuperadas a partir dos calos em estudo.

Com a finalidade de otimizar a regeneração destes materiais, quatro experimentos foram realizados a partir de meio básico MR, utilizando-se calos tolerantes e controle da linhagem TuxMo-1. Meios de cultura contendo diferentes concentrações de sacarose (3 e 6%), na presença de cinetina ($10\mu\text{M}$), ou 6-BA ($5\mu\text{M}$) ou combinação de ambas as citocininas, suplementadas ou não com carvão ativado, não tiveram nenhum efeito positivo sobre a capacidade de regeneração. O uso de 2,4-D ($10\mu\text{M}$) na presença de carvão ativado, seguidos de meio MR com e sem carvão também não alterou a capacidade de regeneração desta linhagem. A frequência de setores embriogênicos foi aumentada utilizando-se concentrações elevadas de cinetina ($160\mu\text{M}$) na presença de 3 ou 6% de sacarose.

A baixa capacidade de regeneração dos calos tolerantes ou controles das linhagens TuxMo-1, Cat100-1 e Cat100-6, após sucessivas subculturas, na presença ou não de glifosato, possivelmente se deve a uma seleção negativa de setores embriogênicos. A regeneração de plantas em alta frequência a partir destes materiais seria teoricamente possível, através de uma nova seleção de setores embriogênicos a partir dos calos existentes.

5. CONCLUSÃO

A utilização da técnica de cultura de tecidos para a seleção "in vitro" de mutantes bioquímicos tolerantes ao herbicida glifosato mostrou-se eficiente na seleção de calos embriogênicos friáveis de milho das linhagens Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1. Foi observado que dentro dos limites de redução (70-90%) da taxa de crescimento, a linhagem TuxMo-1 apresentou a maior redução de crescimento na presença do herbicida, enquanto que a linhagem Cat100-1 teve um comportamento intermediário e a linhagem Cat100-6 foi o genótipo que apresentou uma maior tolerância nos testes utilizados.

A seleção de mutantes de milho tolerantes ao herbicida glifosato, através do uso de calos embriogênicos friáveis, demonstrou que as três linhagens de milho utilizadas apresentaram um ganho de seleção. Os controles de calos das três linhagens apresentaram resultados semelhantes aos calos originais.

A utilização de plântulas das mesmas linhagens de calos, submetidas a diferentes concentrações de glifosato em solução nutritiva, demonstrou que os dois sistemas (calos e plântulas) são capazes de discriminar genótipos quanto à suscetibilidade/tolerância ao herbicida.

O estudo da absorção de glifosato ^{14}C nos calos das três linhagens, demonstrou que as diferenças no crescimento entre os calos controles e tolerantes possivelmente não são devido a barreiras na

absorção do herbicida e sim a outros fatores.

A análise bioquímica da enzima EPSPs através do método de HPLC mostrou ser eficiente, mesmo sendo obtido apenas um pequeno aumento da atividade específica da enzima nos materiais selecionados. A análise através da liberação de Pi não mostrou diferenças entre os calos controle e tolerantes das três linhagens, provavelmente porque o método não foi sensível para detectar pequenas diferenças entre as linhagens.

Não foi possível determinar a causa da tolerância, uma vez que as características bioquímicas avaliadas mostraram pequenas diferenças entre os materiais selecionados e controles.

Portanto, a resposta de tolerância ao herbicida glifosato em calos embriogênicos friáveis de milho pode ser devido a: (1) aumento do substrato da enzima EPSPs (S3P e PEP); (2) alteração da estrutura da enzima EPSPs, tornando-a menos sensível na presença do glifosato; (3) aumento da concentração da enzima.

A taxa de regeneração foi baixa devido ao pequeno número de setores embriogênicos selecionados, não sendo possível a realização de análise genética dos materiais estudados.

6. RESUMO

O uso de produtos químicos para o controle de ervas daninhas é uma técnica bastante aplicada na agricultura. Para muitas culturas ainda não há um herbicida seletivo adequado, duas alternativas têm sido utilizadas para solucionar este problema. A primeira é o desenvolvimento de um herbicida seletivo ou de uma nova formulação para um já existente. Esse processo, entretanto é prolongado e caro, pois o desenvolvimento de um produto novo requer testes sofisticados de milhares de compostos. A segunda alternativa, é a seleção de plantas tolerantes a um determinado produto químico já existente, que possa ser utilizado como herbicida não seletivo.

O estudo da tolerância "in vivo" para caracterização e isolamento dos produtos metabólicos de plantas inteiras, após a aplicação do herbicida, é dificultado, pois este sofre influência de várias funções fisiológicas (absorção, translocação, tempo, etc.) que devem ser considerados.

Uma alternativa é a utilização de técnicas de cultura de células e tecidos, as quais possibilitam uma melhor identificação e seleção de genótipos tolerantes a herbicidas. Além disso, estas técnicas permitem o estudo de sistemas enzimáticos, fornecendo desta forma dados sobre o sítio primário de ação do herbicida.

O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito de um herbicida não seletivo, o glifosato, em cultura de tecidos de milho.

O glifosato tem sido largamente utilizado como um herbicida não seletivo. É rapidamente translocado nas plantas e é biodegradado por microrganismos do solo. Atua ao nível molecular através da inibição da biossíntese dos aminoácidos aromáticos, interferindo na atividade da enzima 5-enolpiruvil shiquimato 3-fosfato sintetase (EPSPs).

Para o estudo do glifosato foram utilizados calos embriogênicos friáveis das linhagens de milho Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1 (Banco de Germoplasma da UNICAMP, Depto. de Genética e Evolução). A escolha da concentração subletal do glifosato a ser utilizada para a seleção, foi determinada como sendo aquela que produziu um decréscimo na taxa de crescimento dos calos, entre 70-90%, quando submetidos a um gradiente de concentração de glifosato variando de 0 a 2,4mM. De acordo com os resultados obtidos, os calos das linhagens Cat100-1, Cat100-6 e TuxMo-1 foram selecionados na concentração de 0,6; 2,4 e 0,3mM respectivamente.

Foram realizadas 10 subculturas na presença das dosagens subletais para cada linhagem. Os calos selecionados bem como os controles foram então submetidos a uma série de 10 subculturas na ausência de glifosato e a seguir foram novamente submetidos a um gradiente de concentração de glifosato variando de 0 a 4,8mM. Os calos selecionados e controles para cada linhagem apresentaram diferenças significativas com respeito à taxa de crescimento.

A comparação do efeito do glifosato em calos embriogênicos friáveis das três linhagens de milho, apresentou uma resposta de tolerância diferencial entre as linhagens estudadas, onde a linhagem

Cat100-6 demonstrou uma maior tolerância nos testes utilizados e a linhagem TuxMo-1 foi a que apresentou uma maior redução no crescimento na presença do herbicida.

Plântulas de milho das mesmas linhagens dos calos foram cultivadas em solução nutritiva contendo diferentes concentrações do herbicida glifosato. Considerando os parâmetros analisados (comprimento da radícula, peso seco da parte aérea e peso seco da raiz), verificou-se que a linhagem Cat100-6 é a mais tolerante ao herbicida glifosato do que as linhagens Cat100-1 e TuxMo-1, que apresentaram comportamento semelhantes.

Estes resultados demonstraram que a utilização da técnica de cultura de tecidos para a seleção "in vitro" de mutantes tolerantes ao glifosato mostrou ser eficiente na seleção de calos de milho. Os mesmos apresentaram uma boa repetibilidade na resposta ao herbicida quando plântulas das mesmas linhagens de calos foram submetidas ao tratamento com glifosato. Isto demonstrou que os dois sistemas são capazes de discriminar genótipos quanto à suscetibilidade/tolerância ao glifosato.

Foram realizados estudos quanto à capacidade de absorção do glifosato e também quanto às propriedades da enzima alvo (EPSPs).

Calos controles e tolerantes de cada linhagem, apresentaram uma rápida absorção do herbicida após uma hora de incubação em meio contendo glifosato- C, atingindo um pico a 1,5 horas, diminuindo em seguida. Os resultados obtidos sugerem que não houve alteração no mecanismo de absorção entre as subpopulações controle e tolerantes

das três linhagens.

A atividade da enzima alvo do glifosato, 5-enolpiruvil shiquimato 3-fosfato sintetase (EPSPs), foi determinada para as subpopulações controles e tolerantes das três linhagens de calos através do método de liberação de Pi e pelo método de Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Sómente o método de HPLC demonstrou uma diferença da atividade específica da EPSPs de 2,08X para a subpopulação tolerante da linhagem Cat100-6, 1,4X para os calos tolerantes da linhagem TuxMo-1. Não foi observado diferenças na atividade da enzima entre os calos tolerantes e controles da linhagem Cat100-1.

Com os resultados bioquímicos realizados não foi possível determinar com precisão o mecanismo de tolerância dos calos selecionados.

SUMMARY

The use of chemical products for weed control is a widely employed technique in agriculture. In the case of many cultures, there is not an adequate selective herbicide yet. However, there are two alternatives that can be used to solve this problem. The first one is the development of a selective herbicide or a new composition for a already existing herbicide, but this process takes a long time and is expensive since the development of a new products requires sophisticated tests of many compounds. The second alternative is the selection of plants that are tolerant to a certain already know chemical product that could be used as non-selective herbicide.

The study of "in vivo" tolerance for characterization and isolation of metabolic products from whole plants, after the use of the herbicide, is difficult because of the influence of many physiological functions (absorption, translocation, time, etc.) that have be considered.

One alternative is the use of tissue and cell culture techniques that allow the study of enzymatic system which supplies information about primary target of the herbicide action.

The objective of the present study is to gather data on the effect of non selective herbicide, glyphosate, in maize tissue culture.

Glyphosate has been largely employed as a non-selective herbicide. It is quickly translocated in the plants and is biodegraded by the soil microorganisms. It acts at the molecular level by the inhibition of the aromatic amino acids biosynthesis and interferes with the activity of the 5-enolpyruvyl shikimate 3-phosphate synthase (EPSPs) enzyme.

Friable embryogenic calli from the maize inbred line Cat100-1, Cat100-6 and TuxMo-1 were used in the study of the glyphosate effect. The maize inbred lines were obtained from the Maize Genetics Laboratory - UNICAMP. The sublethal concentration of the herbicide to be used for selection was determined as the one that permitted 70-90% of calli growth when submitted to glyphosate gradient concentrations from 0 to 2.4 mM. According to the obtained results, calli from inbred lines Cat100-1, cat100-6 and TuxMo-1 were selected for the herbicide concentrations of 0.6, 2.4 and 0.3 mM, respectively.

Ten subcultures were done in the presence of sublethal dosages for each inbred line. The selected calli, as well as the controls, were submitted to a series of ten subcultures in the absence of glyphosate. Afterwards, they were submitted once again to a glyphosate gradient which concentration varied from 0 to 4.8 mM. The selected calli and the controls of each inbred line showed significant growth rate difference.

The comparison of the glyphosate effect in the friable embryogenic calli showed a different tolerance response among the three maize inbred lines used. The inbred line Cat100-6 was the most

tolerant one, and the inbred line TuxMo-1 was the one that presented the biggest growth reduction in the herbicide presence.

Maize seedlings from Cat100-1, Cat100-6 and TuxMo-1 were cultivated in nutritive solution containing different glyphosate concentrations. Considering the analysed parameters (root length, root dry weight and leaves dry weight), it was observed that the inbred line Cat100-6 is the more tolerant to glyphosate than the inbred lines Cat100-1 and TuxMo-1, which showed similar behavior.

These results demonstrated that the use of tissue culture techniques for the "in vitro" selection of glyphosate tolerant mutants is efficient for the selection of maize calli. The maize calli showed a good repetitiveness response to the herbicide when seedlings of the same inbred lines as the calli were submitted to glyphosate treatment. This results demonstrated that the differences found among the inbred lines should be due to genetic factors.

Studies regarding the glyphosate absorption capacity and the EPSP synthase target enzyme properties were performed.

Control and tolerant calli from each line presented a rapid herbicide absorption after one hour of incubation in medium containing glyphosate- C. The peak was achieved within one hour and a half, falling afterwards. This behavior was observed for the inbred lines (control and tolerant calli). The results showed that there was no alteration in the absorption mechanism among the control and tolerant subpopulations of the three inbred lines.

The activity of the glyphosate target enzyme EPSP synthase was determined for the control and tolerant subpopulations of the three inbred lines. The methods used were Pi liberation and HPLC. Only the HPLC method showed a difference in the EPSP synthase activity of 2.08x for the tolerant subpopulation of the inbred line Cat100-6 and of 1.4x for the tolerant calli of the inbred line TuxMo-1. It was not observed differences in the enzyme activity for the tolerant and control calli of the inbred line Cat100-1.

Biochemical studies did not determine with precision the tolerance mechanism of the selected calli.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AMRHEIN, N., DEUS, B., GEHRKE, P., & STEINRUCKEN, H.C. 1980. The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. II- Interference of glyphosate with chorismate formation **in vivo** and **in vitro**. **Pl. Physiol.**, **66**: 830-834.
- AMRHEIN, N., JOHANNING, D., SCHAB, J., & SCHULZ, A. 1983. Biochemical basis for glyphosate-tolerance in a bacterium and a plant tissue culture. **FEBS Letters**, **157(1)**: 191-196
- AMRHEIN, N., HOLLANDER, C.H., JOHANNING, D., SCHULZ, A., SMART, C. C., & STEINRUCKEN, H.C. 1987. Overproduction of 5-enolpyruvyl-shikimate 3-phosphate synthase in glyphosate-tolerant plant cell cultures. In: **Plant Tissue Cell Culture: Plant Biology**, v.3 (Green et al, eds.), Alan R. Liss Inc., New York
- ASHTON, F.M., & CRAFTS, A.S. 1981. **Mode of action of herbicides**. John Wiley & Sons, New York. 525p.
- ANON. 1968. **Principles of plant and animal pest control**, vol. 2, Weed Control, Pub. 1975. National Academic of Science, Washington, D.C. 471p.
- CAMPBELL, W.F., EVANS, J.O., & REED, S.C. 1976. Effects of glyphosate on chloroplast ultrastructure of quackgrass mesophyll cells. **Weed Science**, **24**: 22-25.

CHALEFF, R.S. 1980. Further characterization of picloram-tolerant mutants of *Nicotiana tabacum*. **Theor. Appl. Genet.**, **58**: 91-95.

CHALEFF, R.S. 1981. **Genetics of higher plants: Applications of cell culture**. Cambridge Univ. Press, New York.

CHALEFF, R.S. 1986. Selection for herbicide-resistance mutants. In: **Handbook of Plant Cell Culture, vol. 4** (D.A., Evans; W.R., Sharp; P.V., Ammirato and Y., Yamada, eds). Macmillan Publishing Co., New York, p.133-148.

CHALEFF, R.S., & RAY, T.B. 1984. Herbicide-resistant mutants from tobacco cell cultures. **Science**, **223**: 1148-1151.

CHALEFF, R.S., & MAUVAIS, C.J. 1984. Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. **Science**, **224**: 1143-1145.

CHALEFF, R.S., DUMAS, K.S., LA ROSSA, R.A., LITO K.J., MAUVAIS, C.J., MAZUR, B.J., RAY, T.B., SCHLOSS, J.V., & YADAV, N.S. 1985. Molecular biology of sulfonylurea herbicide activity. In: **Biotechnology in Plant Science** (Zaitlin, Day and Hollaender eds). Academic Press Inc., New York.

CHU, C.C., WANG, C.G., SUN, C.S., HSU, C., YIN, K.C., & CHU, C.Y. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources. **Sci. Sin.**, **16**: 659-688.

COMAI, L.; SEN, L.C., & Stalker, D.M. 1983. An altered **aroA** gene product confers resistance to the herbicide glyphosate. **Science**, **221**: 370-371.

COMAI, L., FACCIOTTI, D. HEATT, W.R., THOMPSON, G., ROSE, R.E., & STALKER, D.M. 1985. Expression in plant of a mutant **aro A** gene from **Salmonella typhimurium** confers tolerance to glyphosate. **Nature**, **317**: 741-744.

CREASON, G.L., & CHALEFF, R.S. 1988. A second mutation enhances resistance of a tobacco mutant to sulfonylurea herbicides. **Theor. Appl. Gen.**, **76**: 177-182.

CROCOMO, O.J., & OCHOA-ALEJO, N. 1983. Herbicide tolerance in regenerated plants. In: **Handbook of Plant Cell Culture, vol.1** (D.A., Evans; W.R., Sharp; P.V., Ammirato and Y., Yamada, eds). Macmillan Publishing Co., New York, p.770-781.

DEAK, M., DONN, G. FEHER, A., & DUDITS, D. 1988. Dominant expression of a gene amplification related herbicide resistance in **Medicago** cell hybrids. **Plant Cell Reports**, **7**: 158-161.

DUNCAN, K., LEWENDON, A., & COGGINS, J.R. 1984. The purification of 5-enolpyruvyl-shikimate 3-phosphate synthase from an overproducing strain of **Escherichia coli**. **FEBS Letters**, **165** (1): 121-127.

FAULKNER, J.S. 1982. Breeding Herbicide-Tolerant Crop cultivars

- by conventional methods. In: **Herbicide Resistance in Plants.** (Le Baron, H.M. & Gressel, J., eds.). John Wiley & Sons, New York, p.235-256.
- FEDTKE, C. 1982. *Biochemistry and Physiology of Herbicide Action.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 202p.
- FERNANDEZ, C.H. 1979. A review of Roundup herbicide. I- Factors affecting performance. II- Mechanism of action. Mimeogr., Monsanto, St. Louis, MO. 46p.
- FLICK, C.E. 1983. Isolation of mutants from cell culture. In: **Handbook of Plant Cell Culture.** Vol.1 (D.A., Evans; W.R., Sharp; P., Ammirato; Y., Yamada, eds.). Macmillan Publishing Co., New York, p.442-460.
- GENGENBACH, B.G., GREEN, C.E., & DONOVAN, C.M. 1977. Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell cultures. **Proc. Natn. Acad. Sci. USA, 74:** 5113-5117.
- GILCHRIST, D.G., & KOSUGE, T. 1980. Aromatic aminoacid biosynthesis and its regulation. In: **The Biochemistry of Plants, Vol.5.** (P.K., Stumpf; E.E., Conn, eds). Academic Press Inc., New York, cap.13
- HADERLIE, L.D., WIDHOLM, J.M., & SLIFE, F.W. 1977. Effect of glyphosate on carrot and tobacco. **Pl. Physiol., 60:** 40-43.
- HANDRO, W. 1981. Mutagenesis and "in vitro" selection. In: **Plant**

Tissue Culture-Methods and Applications in Agriculture. (Trevor A. Thorp. eds.). Academic Press Inc., New York, p.155-180.

HARD, R.W.F., & GIAQUINTA, R.T. 1984. Molecular Biology of Herbicides. **Bioassays**, 1: 152-156.

HATZIOS, K.K., & PENNER, D. 1981. **Metabolism of herbicides in higher plants.** Burgess Publishing Co., Minnesota, 142p.

HERBICIDE HANDBOOK of the Weed Science Society of America 5th.ed. 1983. Herbicide Committee, C.E. Beste, Chairman Publ. by Weed Society of America, Champaign, Illinois.

HOLLANDER, H.C., & AMRHEIN, N. 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. I- Inhibition by glyphosate of phenylpropanoid synthesis in buckwheat (**Fagopyrum esculentum** Moench). **Pl. Physiol.**, 66: 823-829.

HOLLANDER, H.C., & AMRHEIN, N. 1983. Subcellular compartmentation of shikimic acid and phenylalanine in buckwheat at cell suspension cultures grown in the presence of shikimate pathway inhibitors. **Plant Science Letters**, 29: 89-96.

HUGHES, K. 1983. Selection for herbicide resistance. In: **Handbook of plant cell culture. Vol.1.** (D.A., Evans; W.R., Sharp; P.V., Ammirato; Y., Yamada, eds). Macmillan Publishing Co., New York, p.442-460.

ISHIKURA, N., & TAKESHIMA, Y. 1984. Effects of glyphosate on

caffeic acid metabolism in **Perilla** cell suspension culture.
P1. Cell Physiol., 25(1): 185-189.

JACOBS, M. 1984. Selection of biochemical mutants-respective merits of the "in vitro" and whole-plant approaches. Selection in Mutation Breeding-International Atomic Energy Agency, Vienna. p.135-143.

JAWORSKI, E.G. 1972. Mode of action of N-phosphonomethy glycine: inhibition of aromatic aminoacid biosynthesis. **J. Agr. Ed. Chem., 20:** 1195-1198.

JENSEN, K.I.N. 1982. The roles of uptake, translocation and metabolism in the differential intraspecific responses to herbicides. In: **Herbicide Resistance in Plants.** (Le Baron, H.M. & Gressel, J.; eds.). John Wiley & Sons, New York, p.133-162.

LA ROSSA, R.A. & FALCO, S.C. 1984. Amino acid biosynthetic enzyme as a target of herbicide action. **Trends in Biotechnology, 2(6):** 158-161.

LAEMMLI, V.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature, 227:** 680-683.

MALIGA, P. 1978. Resistance mutants and their use in genetic manipulation. In: **Frontiers of Plant Tissue Culture.** (Thorpe T.A., eds.). p.381-392.

MALIGA, P. 1984. Isolation and characterization of mutants in
.98.

plant cell culture. **A. Rev. Pl. Physiol.**, **35**: 519-542.

MEREDITH, C.P., & CARLSON, P.S. 1982. Herbicide Resistance in Plant Cell Cultures. In: **Herbicide Resistance in Plants** (Le Baron, H.M. & Gressel, J.; eds.). John Wiley & Sons, New York, p.275-292.

MIAO, S., DUNCAN, D.R., & WIDHOLM, J. 1988. Selection of regenerable maize callus culture resistant to 5-methyltryptophan aminoethylcystein and high levels of L-lysine plus L-treonine **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **14**: 3-14.

MOUSDALE, D.M. & COGGINS, J.R. 1985. Purification and properties of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase from seedlings of **Pisum sativum** L. **Planta**, **160**: 78-83.

MOUSDALE, D.M., & COGGINS, J.R. 1985. Subcellular localization of the common shikimate-pathway enzymes in **Pisum sativum** L. **Planta**, **163**: 241-249.

MURASHIGE, T., & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia. Pl.**, **15**: 473-479.

NABORS, M.W., GIBBS, S.E., BERNSTEIN, C.S., & MEIS, M.E. 1980. NaCl-tolerant tobacco plants from cultured cells. **Z. PflPhysiol.**, **97(1)**: 13-18.

NAFZIGER, E.D., WIDHOLM, J.M., STEINRUCKEN, H.C., & KILMMER, J.

L. 1984. Selection and characterization of a carrot cell line tolerant to glyphosate. **Pl. Physiol.** **76**: 571-574.

PRIOLI, A.J. 1987. **Análise genética da tolerância à toxidez do alumínio em milho (Zea mays L.)**. Tese de doutorado. UNICAMP.

PRIOLI, L.M. 1987. **Cultura de tecidos e células, controle genético da embriogênese somática e variação somaclonal em milho (Zea mays L.)**. Tese de doutorado. UNICAMP.

RAY, T.B. 1986. Sulfonyleurea herbicide as inhibitors of aminoacid biosynthesis in plants. **Trends Biochem. Sci.**, **11(4)**: 180-183.

RUBIN, J.L., GAINES, C.G., & JENSEN, R.A. 1984. Glyphosate inhibition of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase from suspension-culture cells of **Nicotiana silvestris**. **Pl. Physiol.**, **75**: 839-845.

SCHULZ, A., SOST, D., & Armhein, N. 1984. Insensitivity of 5-enolpyruvylshikimate 3 phosphate synthase to glyphosate confers resistance to the herbicide in a resistance to this herbicide in a strain of **Aerobacter aerogenes**. **Archs. Microbiol.**, **137**: 121-123.

SEPECTOR, T. 1978. Refinement of the Coomassie Blue method of protein quantitation. **Anal. Biochem.**, **86**: 142-146.

SHAH, D.M., HORSCH, R.B., KLEE, H.J., KISHORE, G.M., WINTER, J.A. TUMER, N.E., HIRONAKA, C.M., SANDERS, P.R., GASSER, C.S.,

- AYKENT, S., SIEGEL, N.R., ROGERS, S.G., & FRALEY, R.T. 1986. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. **Science**, **233**: 478-480.
- SHANER, D.L., ANDERSON, P. C., & STIDHAM, M. A. 1984. Imidazolinones--Potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. **Pl. Physiol.**, **76**: 545-546.
- SHANER, D.L., & ANDERSON, P.C., 1985. Mechanism of action of the imidazolinones and cell culture selection of tolerant maize. In: *Biotechnology in Plant Science* (Zaitlin, Day and Hollander eds.) Academic Press Inc., New York, p.287-299.
- SINGER, S.R., & McDaniel, C.N. 1984. Selection of amitrole-tolerant tobacco calli and the expression of this tolerance in regenerated plants and progeny. **Theor. Appl. Genet.**, **67**: 427-432.
- SMART, C.C., JOHANNING, D., MULLER, G., & AMRHEIN, N. 1985. Selective overproduction of 5-enolpyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. **J. Biol. Chem.**, **260** (30): 16338-16346.
- SMITH, C.M., PRATT, D., & THOMPSON, G.A. 1986. Increased 5-enolpyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase activity in a glyphosate-tolerant variant strain of tomato cells. **Plant Cell Reports**, **5**: 298-301.

- SPRANKLE, P., MEGGITT, W.F., & PENNER, D. 1975. Absorption, mobility and translocation of glyphosate. **Weed Science**, **23**: 235-240.
- STALKER, D.M., HIATT, W.T., & COMAI, L. 1985. A single amino acid substitution in the enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate. **J. biol. Chem.**, **260(6)**: 4724-4728.
- STEINRUCKEN, H.C., & AMRHEIN, N. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate acid 3-phosphate synthase. **Biochem. biophys. Res. Commun.**, **94(4)**: 1207-1212.
- STEINRUCKEN, H.C., SCHULZ, A., AMRHEIN, N., PORTER, C.A., & FRALEY, R.T. 1986. overproduction of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in a glyphosate-tolerant **Petunia hybrida** cell line. **Archs Biochem. Biophys.**, **244(1)**: 169-178.
- SUNG, Z.R. 1979. Relationship of indole-3-acetic acid and tryptophan concentrations in normal and 5-methyltryptophan-resistant cell lines of wild carrots. **Planta**, **145(4)**: 339-346.
- SWANSON, E. B., COUMANS, M. P., BROWN, G. L., PATEL, J. D., & BEVERSDORF, W.D. 1988. The characterization of herbicide tolerant plants in **Brassica napus** L. after in vitro selection of microspores and protoplasts. **Plant Cell Reports**, **7**: 83-87.
- THOMAS, B.R., & PRATT, D. 1982. Isolation of paraquat-tolerant mutants from tomato cell cultures. **Theor. Appl. Genet.**, **63**: 169-176.