

HERANÇA DA RESISTÊNCIA DE AZEVÉM (*Lolium multiflorum* L.)

AO GLYPHOSATE

Juliana de Paula¹; Leandro Vargas²; Rita Maria Alves de Moraes²; Dirceu Agostinetto¹; Taísa Dal Magro¹

¹ UFPel-FAEM-DFs-CEHERB (Centro de Herbologia) - Campus Universitário, Caixa Postal 354 – CEP.: 96010-900; ² EMBRAPA Trigo, Passo Fundo-RS.

RESUMO

O glyphosate é o principal produto usado para manejo não seletivo das plantas daninhas. Contudo, já foram identificados biótipos de azevém resistentes a este herbicida no Rio Grande do Sul os quais estão se tornando predominantes rapidamente. Objetivou-se neste trabalho identificar o tipo de herança, número de genes que conferem resistência e o grau de resistência dos biótipos homozigotos e heterozigotos resistentes em azevém. Foram realizados cruzamentos recíprocos entre genitores suscetível e resistentes para obtenção de sementes F_1 e, em seguida, efetuou-se os retrocruzamentos resistente e sensível. Plantas F_1 foram cruzadas para obtenção da geração F_2 . Sobre as plantas F_1 , F_2 , RC_r e RC_s e genitores foi aplicado o herbicida glyphosate na dose de 720 g e.a. ha^{-1} para avaliar a segregação. Para avaliar o grau de resistência as plantas F_1 e os genitores resistente e sensível foram tratadas com doses crescentes de glyphosate (0, 360, 720, 1.440 e 2.880 g e.a. ha^{-1}). As plantas F_1 evidenciaram resposta intermediária ao biótipo resistente e sensível, demonstrando que a interação alélica é do tipo dominância incompleta. As plantas F_2 apresentaram tendência para segregação 3:1, indicando que a característica resistência ao glyphosate é controlada por um gene semidominante.

Palavras-chave: herbicidas; hibridação; inibidores de EPSPs.

ABSTRACT- Inheritance of resistance in azevém (*Lolium multiflorum* L.) to glyphosate

Glyphosate is a non-selective herbicide used to control weeds. However, azevem plants, tolerant to glyphosate, have already been described in Rio Grande do Sul, which ones are becoming predominant. The objective of this work was to identify the inheritance, number of genes and the degree of resistance in azevem plants. Reciprocal crossings between sensitive and resistant plants had been carried for obtaining F_1 seeds which ones were crossed among them to obtaining plants F_2 . On the F_1 , F_2 , RC_r , RC_s and the progenitors was applied the herbicide containing 720 g a.i. ha^{-1} to estimate segregation. To evaluate the degree resistance the F_1 plants, progenitors were sprayed with increasing doses of glyphosate (0; 360; 720; 1,440 and 2,880 g a.i. ha^{-1}). F_1 plants showed intermediate behaviour between resistant and sensitive phenotypes, indicating that the

resistance is transmitted by incomplete dominance way. F2 plants presented trend for segregation 3:1, indicating that the resistance is controlled by a single semidominant gene.

Key-words: herbicides; hybridation; EPSPs inhibitors.

INTRODUÇÃO

O glyphosate [N-(phosphonomethyl) glycine] é um herbicida pós-emergente, não seletivo, do grupo das glicinas substituídas e comercializado no Brasil desde 1976. É um herbicida sistêmico, translocado via xilema e floema, acumulando-se nas regiões meristemáticas, que age inibindo a enzima 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase (EPSPs). A enzima EPSPs catalisa a condensação do ácido shiquímico com o piruvato para formar o corismato, na rota de síntese dos aminoácidos essenciais triptofano, fenilalanina e tirosina. O glyphosate é o herbicida mais utilizado na agricultura e é imprescindível para a dessecação, para formar a cobertura morta (palhada), no sistema plantio direto, devido a sua eficiência e baixo custo. O azevém (*Lolium multiflorum*) apresenta fecundação cruzada, é uma gramínea, de inverno, com ciclo anual, utilizada principalmente como forrageira e para fornecimento de palha para o sistema plantio direto. É uma espécie que se adapta bem em solos de baixa e média fertilidade, com boa resposta a adubação, de fácil dispersão e, por isso, está presente e caracteriza-se como planta daninha em praticamente todas as lavouras de inverno, em pomares e em vinhedos da região sul do Brasil. No trigo, cevada, centeio e triticale, o azevém, muitas vezes, já está presente por ocasião da semeadura dessas culturas. O azevém também é problema em lavouras de milho. O controle do azevém, em pomares e no sistema plantio direto para formar a palhada, é realizado quase que exclusivamente com o herbicida glyphosate. A utilização do glyphosate para controle de azevém, em áreas de plantio direto e em culturas perenes (pomares), é uma prática que vem sendo adotada a mais de 20 anos no Brasil. A preferência, por parte dos agricultores, pelo uso do glyphosate deve-se, principalmente, ao fato de que este produto apresenta alta eficiência e custo relativamente baixo. Roman et al. (2004) identificaram biótipos de azevém resistentes ao glyphosate no Rio Grande do Sul. O uso repetido do glyphosate para controle da vegetação pode ser o fator responsável pela seleção dos biótipos resistentes. Em geral espécies ou genótipos de uma espécie que melhor se adaptam a uma determinada prática são selecionados e multiplicam-se rapidamente (Holt & Lebaron, 1990). O aparecimento de resistência a um herbicida em uma população de plantas é devido à seleção de um biótipo resistente preexistente, que resulta da pressão de seleção, exercida por repetidas aplicações de um mesmo herbicida ou herbicidas com mesmo mecanismo de ação, encontrando condições

para multiplicação (Betts et al., 1992). Existem seis fatores relacionados ao aparecimento de resistência em uma população de plantas, que interagem e determinam a probabilidade e o tempo de evolução da resistência. São eles: número de alelos envolvidos na expressão da resistência; a frequência do(s) alelo(s) da resistência na população inicialmente sensível; o modo de herança do(s) alelo(s) da resistência (materna ou paterna); o modo de reprodução da espécie; a pressão de seleção e a taxa de cruzamentos entre biótipos resistentes e sensíveis (Mortimer, 1998). As características hereditárias são controladas pelos genes, que podem apresentar formas alternativas denominadas alelos. Na determinação da herança, é necessário que o caráter considerado apresente expressões contrastantes, ou seja, que exista variabilidade. Quando somente um gene está envolvido na resistência de uma determinada característica ela é chamada de monogênica. Por outro lado, se poucos ou muitos genes conferem a resistência, esta é chamada de oligogênica e poligênica, respectivamente. Quanto maior o número de genes envolvidos mais lenta será a evolução da resistência em uma população, pois características poligênicas dependem da combinação de vários genes na mesma planta. O tipo de herança do(s) alelo(s) de resistência é ponto crucial no estabelecimento e disseminação da resistência em uma população de plantas. Existem dois tipos de herança, a citoplasmática (materna) e a nuclear. Herança citoplasmática é aquela onde os caracteres hereditários são transmitidos via genes do citoplasma, assim somente a planta mãe poderá transmitir a resistência para os filhos; um exemplo são as plantas resistentes às triazinas. Por outro lado, se a herança for nuclear, a transmissão será via genes nucleares e, desta forma, tanto o pai como a mãe contribuem na transmissão da resistência. O processo da evolução da resistência a herbicidas, resumidamente, passa por três estádios: eliminação dos biótipos altamente sensíveis, restando apenas os mais tolerantes e resistentes; eliminação de todos os biótipos exceto os resistentes, seleção destes dentro de uma população com elevada tolerância; intercruzamento entre os biótipos sobreviventes, gerando novos indivíduos com maior grau de resistência, que serão selecionados futuramente, segregação e recombinação de genes (Mortimer, 1998). O número de regiões infestadas com azevém resistente ao glyphosate está aumentando rapidamente e já são mais de dez municípios gaúchos com casos de resistência confirmados. Esse fato evidencia que as plantas resistentes estão se multiplicando e disseminando e que a resistência está sendo transmitida hereditariamente. A caracterização da resistência do azevém ao glyphosate, quanto ao número de genes e tipo de herança, é fundamental para que técnicas de manejo sejam

recomendadas e utilizadas no sentido de evitar e/ou retardar o aparecimento e a multiplicação das plantas resistentes. O objetivo deste trabalho foi identificar o tipo de herança, número de genes envolvidos e o grau de resistência dos biótipos, de *Lolium multiflorum* L., homozigotos e heterozigotos resistentes ao glyphosate.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação, na Embrapa Trigo, em Passo Fundo-RS, nos anos de 2004, 2005 e 2006. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Os genitores resistentes foram obtidos de plantas oriundas de áreas com ocorrência de resistência comprovada e submetidas a sucessivas seleções com uso do glyphosate na dose de 3.600 g e.a. ha⁻¹. Os genitores sensíveis foram obtidos em áreas onde não se usava glyphosate e submetidas a avaliação de sensibilidade com tratamento de 360 g e.a. ha⁻¹ glyphosate. Para testar a sensibilidade foram semeadas 20 sementes de cada genitor sensível avaliado em uma bandeja com capacidade para 5 kg de terra. Quando as plantas, originadas destas sementes atingiram estágio de 3-4 folhas aplicou-se o herbicida glyphosate (360 g e.a. ha⁻¹). Todos os genitores onde ocorreu morte de todas as plantas avaliadas foram considerados homozigotos sensíveis. Por outro lado, considerou-se homozigotos resistente aqueles genitores em que todas as plantas testadas mostraram-se resistentes ao tratamento herbicida com glyphosate (3.600 g e.a. ha⁻¹). Foram selecionados oito genitores homozigotos resistentes e cinco homozigotos sensíveis ao glyphosate. Para realizar os cruzamentos, selecionou-se cinco genitores homozigotos resistentes e cinco genitores homozigotos sensíveis e foram constituídos cinco pares (R x S). Sementes de cada genitor foram semeadas em vasos com capacidade para 5L. Após a emergência das plantas, foi procedido desbaste, deixando-se uma planta por vaso. Um vaso contendo o genitor resistente e um vaso contendo o genitor sensível foram colocados em estufas individualizadas e vedadas para evitar contaminações com pólen externo. Dessa forma, foi aceito que os genitores foram polinizados somente com polén oriundo de seu par. Foram realizados manualmente cruzamentos recíprocos nos cinco pares de genitores sensíveis e resistentes para obtenção de sementes F₁. Depois disso, foram selecionados três pares de genitores e realizados retrocruzamentos entre plantas F₁ e os respectivos genitores masculinos e femininos resistentes (RCr) e sensíveis (RCs). Sementes F₁ foram semeadas em vasos e as plantas originadas destas sementes foram cruzadas para obtenção da F₂. As sementes F₁, F₂, RCr e RCs e dos genitores foram semeadas em bandejas com capacidade para 5 kg de solo e avaliadas, por meio da aplicação do herbicida glyphosate (720 g e.a. ha⁻¹),

quanto a sua sensibilidade ou resistência. As frequências das classes obtidas foram testadas pelo teste de qui-quadrado. Além disso, foram semeadas, em bandejas, sementes F_1 e dos genitores resistente e sensível. As plantas originadas destas sementes foram tratadas com doses crescentes de glyphosate (0, 360, 720, 1.440 e 2.880 g e.a. ha^{-1}).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número total de plantas, número de plantas resistentes e sensíveis, relações observadas e esperadas, bem como os valores do teste χ^2 e as respectivas probabilidades estão contidas na Tabela 1. Os genitores resistente (R) e sensível (S) confirmaram, respectivamente, sua resistência e sensibilidade ao herbicida. No primeiro cruzamento simples sensível x resistente (S x R), o F_1 apresentou-se totalmente resistente evidenciando que o genitor masculino transmitiu a característica resistência para a prole. A geração F_2 apresentou segregação resistente/sensível 2,5:1 com teste qui-quadrado fornecendo probabilidade de 40% desta ser 3:1. O retrocruzamento sensível (RCs) apresentou segregação resistente/sensível 0,8:1 com a probabilidade de 42,5% de ser 1:1. Já, o retrocruzamento resistente (RCr) apresentou plantas totalmente resistentes, evidenciando, também, o caráter dominante da resistência. No segundo cruzamento simples, agora resistente x sensível (R x S), a geração F_1 , como no primeiro cruzamento, mostrou-se totalmente resistente, indicando que a resistência também é transmitida hereditariamente pela planta mãe e, novamente, que a resistência é uma característica dominante. A F_2 apresentou segregação resistente/sensível 3,3:1, com probabilidade de 63,3% de ser 3:1. O RCr apresentou-se, novamente, totalmente resistente. A geração F_1 , em ambos os cruzamentos, mostrou-se totalmente resistentes ao herbicida, evidenciando que a resistência é uma característica dominante transmitida hereditariamente tanto pelo pai quanto pela mãe, ou seja, a resistência é transmitida por genes nucleares. Estes resultados são confirmados pelos retrocruzamentos. A F_2 apresentou tendência para o padrão de segregação 3:1, indicando que a resistência é codificada por um gene dominante. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Wakelin & Preston (2006) em *Lolium rigidum* e por Ng et al., (2004) em *Eleusine indica*. Por outro lado, Simarmata et al., (2005) concluíram que a resistência de *Lolium rigidum* ao glyphosate é transmitida via pólen, é multigênica, com herança nuclear e dominância incompleta. Para testar a dominância plantas F_1 foram tratadas com doses crescentes de glyphosate (0, 360, 720, 1.440 e 2.880 g e.a. ha^{-1}). Os resultados evidenciam que as plantas, homozigotas resistentes e as heterozigotas, apresentam diferente grau de resistência para doses de até 2.880 g e.a. ha^{-1} de glyphosate, e que as plantas sensíveis morrem com a dose de

360 g e.a. ha⁻¹ (Tabela 2). O biótipo heterozigoto é controlado com dose de 1.440 g e.a. ha⁻¹ (Tabela 2), sendo conceitualmente considerado sensível, uma vez que a dose de 2.160 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate (6 L ha⁻¹ da formulação comercial) é aceita como sendo a dose limite para determinar a sensibilidade, ou seja, somente plantas que sobrevivem a doses acima desta são consideradas resistentes ao glyphosate. Entretanto, também pode-se aceitar que o biótipo heterozigoto apresenta sensibilidade intermediária. Dessa forma, evidencia-se que a resistência apresentada pelos biótipos de azevém é codificada por um gene nuclear com dominância incompleta. As características com herança do tipo nuclear têm disseminação rápida na população, via pólen, em espécies com alta taxa de fecundação cruzada, como é o caso do azevém. A sensibilidade intermediária dos genótipos heterozigotos tem implicações práticas importantes, já que, em lavouras infestadas com essas plantas, o aumento da dose de glyphosate proporcionará aumento no controle. Entretanto, somente os biótipos heterozigotos serão controlados, resultando em maior espaço para crescimento e multiplicação dos biótipos resistentes. Dessa forma, conclui-se que a resistência do azevém (*Lolium multiflorum* L.) ao herbicida glyphosate é codificada por um gene semidominante nuclear, e que o biótipo heterozigoto possui sensibilidade intermediária ao glyphosate e é considerado sensível à este herbicida.

LITERATURA CITADA

- BETTS, K.J.; EHLKE, N.J.; WYSE, D.L.; GRONWALD, J.W.; SOMERS, D.A. Mechanism of inheritance of diclofop resistance in italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). **Weed science**, Champaign, v.40, n.2, p.184-189, 1992.
- HOLT J.S.; LeBARON, H.M. Significance and distribution of herbicide resistance. **Weed technology**, Champaign, v.4, n.1, p.141-149, 1990.
- NG, C.; RATNAM, W.; SURIF, S.; ISMAIL, B.S. Inheritance of glyphosate resistance in goosegrass (*Eleusine indica*). **Weed science**, Champaign, v.52, n.4, p.564-570, 2004.
- MORTIMER, A.M. **Review of graminicide resistance**. 1998. Web: [Http://ipmwww.ncsu.edu/orgs/hrac/monograph1.htm](http://ipmwww.ncsu.edu/orgs/hrac/monograph1.htm), 32 pag.
- ROMAN, E.S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M.A.; MATTEI, R.W. Resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v.22, n.2, p.301-306, 2004.
- SIMARMATA, M.; BUGHRARA, S.; PENNER, D. Inheritance of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium multiflorum*) from California. **Weed science**, Champaign, v.53, n.5, p.615-619, 2005.
- WAKELIN A. M. & PRESTON, C. Inheritance of glyphosate resistance in several populations of rigid ryegrass (*Lolium multiflorum*) from Australia. **Weed science**, Champaign, v.54, n.2, p.212-219, 2006.

Tabela 1 - Avaliação da segregação de cruzamentos simples, retrocruzamentos e cruzamentos recíprocos entre plantas de azevém (*Lolium multiflorum* L.) sensíveis e resistentes aos herbicidas glyphosate. Embrapa Trigo, 2006.

Cruzamento	Número Plantas	Resistentes	Sensíveis	Relação Esper. Obs.		χ^2	Prob.
Sensível	5	0	5	--	--	--	--
Resistente	8	8	0	--	--	--	--
S x R							
F ₁	68	68	0	1:0	1:0	0,000	1,00
F ₂	94	67	27	3:1	2,5:1	0,695	40,45
RCs	77	35	42	1:1	0,8:1	0,636	42,50
RCr	85	85	0	1:0	1:0	0,000	1,00
R x S							
F ₁	116	116	0	1:0	1:0	0,000	1,00
F ₂	146	112	34	3:1	3,3:1	0,23	63,3
RCs	--	--	--	--	--	--	--
RCr	54	54	0	1:0	1:0	0,000	1,00

Tabela 2 - Avaliação de toxicidade, em porcentagem, provocada por doses crescentes de glyphosate aplicados sobre um biótipo azevém (*Lolium multiflorum* L.) sensível, um heterozigoto (F1) e um resistente, em casa-de-vegetação, Embrapa Trigo, 2006.

TRATAMENTO	DOSE g e. a. ha ⁻¹	TOXICIDADE								
		Sensível			Heterozigoto			Resistente		
		15 DAT	30 DAT	45 DAT	15 DAT	30 DAT	45 DAT	15 DAT	30 DAT	45 DAT
Testemunha	- - -	0 b	0 b	0 b	0 e	0 e	0 c	0 c	0 d	0 d
Glyphosate	360	100 a	100 a	100 a	20 d	30 d	35 b	0 c	0 d	0 d
Glyphosate	720	100 a	100 a	100 a	25 d	45 c	40 b	10 b	15 c	10 c
Glyphosate	1.440	100 a	100 a	100 a	55 c	80 b	90 a	15 b	30 b	25 b
Glyphosate	2.160	100 a	100 a	100 a	85 b	100 a	100 a	35 a	50 a	60 a
Glyphosate	2.880	100 a	100 a	100 a	95 a	100 a	100 a	40 a	55 a	70 a

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de probabilidade.

DAT: dias após a aplicação do herbicida