

CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DE ÓRGÃOS VEGETATIVOS DE *Lolium multiflorum* Lam. SENSÍVEL E RESISTENTE AO GLIFOSATO

GALVAN; J.¹; RIZZARDI; M.A.²; CARNEIRO; C.M.³

¹ Universidade de Passo Fundo – RS; (54) 99094353; galvan.j@gmail.com

² Universidade de Passo Fundo – RS; (54) 33168151; rizzardi@upf.br

³ Universidade de Passo Fundo – RS; (54) 33168310; cerci@upf.br

Resumo

Objetivou-se caracterizar anatomicamente a espécie *Lolium multiflorum*, bem como a comparação da mesma entre quatro biótipos dessa espécie com distinta sensibilidade ao herbicida glifosato, sendo um biótipo sensível (B1S) e três biótipos resistentes (B2R, B3R e B4R), a fim de colaborar para o entendimento do mecanismo que confere resistência do azevém a esse herbicida. As análises foram feitas a partir de secções transversais e longitudinais dos órgãos vegetativos de plantas no estágio de afilhamento. Anatomicamente, o azevém caracterizou-se por apresentar grande quantidade de estômatos, assim como de células buliformes. O mesófilo apresentou parênquima paliçádico uniestratificado e parênquima clorofiliano com células bastante compactadas, e feixes vasculares de grande, médio e pequeno porte, tendo a endoderme bastante lignificada. As raízes apresentaram grande quantidade de pêlos absorventes e sua anatomia com padrão poliarca. Comparativamente, não ocorrem diferenças morfológicas evidentes que possam ser usadas para diferir biótipos sensíveis de resistentes, no entanto, nota-se que biótipos resistentes, especialmente B3R e B4R, apresentaram maior densidade estomática frente às demais. Ainda, os biótipos resistentes apresentaram seu mesófilo com maior espaço intercelular, assim como, menor quantidade de floema em relação ao xilema, o que por suas funções na planta, podem colaborar para a menor sensibilidade ao herbicida.

Palavras-Chave: afilhamento, estômatos, impressões foliares, floema, secções anatômicas

Abstract

The aim of the experiment was to characterize anatomically the species ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam) and to compare it among four biotypes of this species with distinct sensitivity to glyphosate herbicide where one biotype was sensitive (B1S) and three were biotypes were resistant (B2R, B3R and B4R) helping to understand the mechanism that checks the ryegrass resistant to this herbicide. The analyses were made from transverse and longitudinal sections of vegetative organs of plants in the tillering stage. Anatomically, the ryegrass was characterized by showing big quantity of stomas as well buliform cells. The mesophyll showed a pale unistratified parenchyma and chlorophyllaceous parenchyma with cells so solid and vascular cluster with large, medium and small size, and they had the endoderm a lot of lignified. The roots showed a big quantity of absorbing hair and their anatomy with polyarchy standard. In comparison, don't occur morphological differences that can be used for differ sensitive and resistant biotypes, however, it's possible to notice that resistant biotypes specially B3R and B4R showed higher stomatic density facing to the others. Resistant biotypes still showed their mesophylls with large intercellular space as well less quantity of phloem relating to xylem, which their functions in the plant, may contribute to the lower sensitivity to the herbicide.

Key Words: anatomy sections, leaf prints, phloem, stomas, tillering,

Introdução

O azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) é uma poácea anual hiberna, amplamente encontrada no Rio Grande do Sul, sendo principalmente utilizada como forrageira para alimentação do rebanho no inverno e como cobertura do solo em pomares e em lavouras no sistema de semeadura direta. O manejo dessa espécie vem sendo feito há muitos anos, quase que exclusivamente, com a utilização de produtos químicos, principalmente o herbicida glifosato.

O uso repetido de glifosato deve-se, principalmente, ao fato de que esse produto apresenta alta eficiência e custo relativamente baixo (VARGAS *et al.*, 2005). Nos últimos anos, os produtores observaram dificuldade para controlar o azevém com o herbicida glifosato (ROMAN *et al.*, 2004). O uso indiscriminado de herbicidas propiciou o desenvolvimento de muitos casos de resistência a tais compostos por diversas espécies daninhas (BURNSIDE, 1992), incluindo para o estado do Rio Grande do Sul o azevém.

A eficácia do glifosato é dependente de processos como a retenção da molécula na superfície foliar, a penetração foliar, a translocação na planta até o sítio de ação e a inibição da enzima-alvo, a 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetase (EPSPs), onde o produto vai exercer sua atividade herbicida (KIRKWOOD & MCKAY, 1994; SATICHIVI *et al.*, 2000). A translocação representa processo essencial para a eficácia do herbicida (WANAMARTA & PENNER, 1989; SATICHIVI *et al.*, 2000), e assim, qualquer impedimento pode resultar em grandes prejuízos na eficiência de controle da espécie alvo.

O glifosato se movimenta no floema seguindo a rota dos produtos da fotossíntese, das folhas fotossinteticamente ativas em direção às partes das plantas em crescimento, para manutenção do metabolismo e/ou formação de produto de reserva, das raízes, dos tubérculos, das folhas jovens e de zonas meristemáticas (HETHERINGTON *et al.*, 1998). Dessa forma, a absorção, a translocação e o metabolismo do herbicida podem afetar a sensibilidade da planta, pois este precisa atingir o sítio de ação numa concentração adequada (FERREIRA *et al.* 2006).

Ferreira *et al.* (2006) constataram que não ocorre diferença significativa entre plantas de azevém de biótipos resistentes e sensíveis quanto a absorção de glifosato. Segundo os mesmos autores, o que tem ocorrido é maior retenção do herbicida nas folhas em biótipos resistentes, enquanto que nos biótipos sensíveis, grande parte do herbicida aplicado na parte aérea é translocado para as raízes.

Considerando os aspectos mencionados, realizou-se a descrição anatômica dos órgãos vegetativos da espécie com o objetivo de identificar características diferenciais entre biótipos sensíveis e resistentes à ação do herbicida glifosato, a fim de verificar uma possível alteração com efeito na translocação e, conseqüentemente na sensibilidade ao herbicida.

Material e Métodos

O material vegetal utilizado nesse trabalho foi semeado no mês de maio de 2008 e cultivado em casa-de-vegetação construída com cobertura plástica transparente e com as paredes de tela do tipo clarite, na Universidade de Passo Fundo. As análises anatômicas foram realizadas no Laboratório Multidisciplinar Vegetal (MULTIVEG) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo (ICB/UPF), no período de setembro a dezembro de 2008.

As sementes de azevém utilizadas no experimento passaram por um teste preliminar de modo a comprovar a sua sensibilidade ou resistência ao herbicida glifosato, tendo sido assim classificadas como: B1S = biótipo sensível e B2R, B3R e B4R = biótipos resistentes.

Quando as plantas estavam na fase de afilhamento, cerca de 50 dias após a emergência das mesmas, foram coletadas e levadas ao laboratório para a lavagem e separação da parte aérea e raízes. Após a lavagem, as plantas foram imediatamente fixadas em Formol Ácido Acético (FAA) 50, onde permaneceram por 48 horas. Após a fixação, o material foi estocado imerso em etanol 70°GL.

Foram utilizadas folhas completamente expandidas, da parte mediana da planta, e as raízes mais desenvolvidas. As secções histológicas foram feitas manualmente com lâminas de barbear.

As secções selecionadas foram clarificadas em hipoclorito de sódio na concentração 20%, para que o material perdesse toda a sua coloração natural. Após, o material foi lavado em água acidulada e destilada. A coloração das secções foi feita com os corantes fucsina básica e azul de Astra ou Alcian.

Após a coloração, o material foi colocado em glicerina 50% e mantido nesse meio "overnight". Depois, foi montado em lâminas usando glicerina 50% como meio de montagem. Para a vedação entre lâmina e lamínula utilizou-se esmalte de unha incolor.

Para a análise da superfície epidérmica selecionou-se folhas antes de serem fixadas, para realizar impressões foliares. Aplicou-se uma fina camada de esmalte de unha incolor, após secar foi retirado da folha com auxílio de fita adesiva transparente e então afixado em lâminas histológicas.

As análises histológicas foram feitas utilizando-se um microscópio óptico (Olympus[®], modelo CX31) e a documentação fotográfica com uma câmara digital (Sony[®], modelo DSC-W50). As fotos foram analisadas, sem edição digital, e descritas de acordo com a nomenclatura histológica atual.

Resultados e Discussão

As folhas de azevém em vista frontal evidenciaram padrão anfiestomático, ou seja, presença de estômatos tanto na face adaxial como abaxial da folha (Figura 1). Os estômatos apresentam a forma de alteres, organizados em fileiras que se intercalam com fileiras sem estômatos, onde eventualmente encontram-se tricomas. Segundo Cutter (1987), a disposição seqüencial dos estômatos em fileiras longitudinais é uma característica das poaceas devido à atividade do meristema intercalar basal.

Os estômatos, que tem por função realizar as trocas gasosas da planta (APPEZZATO-DA-GLÓRIA & CARMELO-GUERREIRO, 2004) têm sua presença e distribuição muito variável nas folhas em função do ambiente em que a planta vive. O número de estômatos por unidade de área assim como o nível posicional das células-guarda com respeito às outras, são tão variáveis que possuem pouco valor taxonômico (ESAÚ, 1993). Tais variações ocorrem tanto entre plantas, como na própria planta.

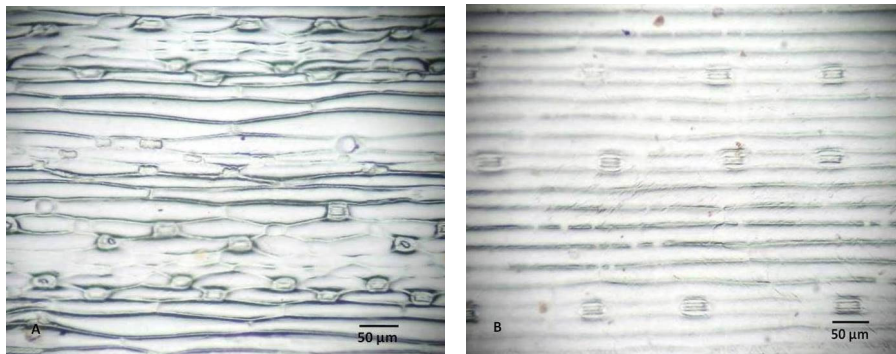
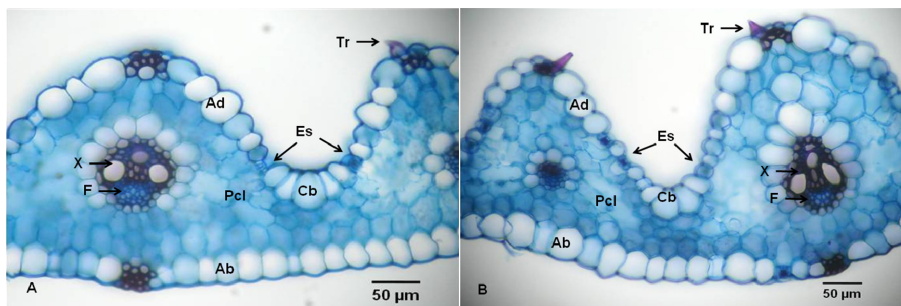


Figura 1 – Vista frontal da epiderme de *Lolium multiflorum*. A – face adaxial; B – face abaxial. UPF, 2008.

A epiderme é o tecido mais externo dos órgãos vegetais, e sua função primordial é revestir os demais tecidos, impedindo a ação de choques mecânicos e a invasão de agentes patogênicos, além de restringir a perda de água (APPEZZATO-DA-GLÓRIA & CARMELO-GUERREIRO, 2004), sendo um tecido com ampla possibilidade de variação na sua forma, em função do ambiente em que se encontra. Em secção transversal as células epidérmicas de azevém, tanto o biótipo sensível como os biótipos resistentes, apresentam-se com paredes periclinais biconvexas, proporcionando maior capacidade de aproveitamento da luz incidente na lâmina foliar (Figura 2).

A face adaxial apresenta ao longo de sua extensão sulcos, onde se localizam as células buliformes, e, ao lado delas, ocorrem os estômatos (Figura 2). Raven *et al.* (2001) classifica as células buliformes, de ocorrência em fileiras longitudinais, como participantes do mecanismo de enrolamento e desenrolamento das folhas em resposta às mudanças de potencial hídrico. A quantidade de células buliformes em cada sulco é variável, inclusive numa mesma folha, ocorrendo geralmente de 4 a 6 células. A parte elevada desses sulcos apresenta feixes de fibras os quais pertencem à extensão da bainha de feixe. Junto a esses feixes de fibras ocorre a presença de tricomas, em forma de agulha, embora não seja uma regra para todos os feixes.

O mesófilo apresentou parênquima clorofiliano com espaços intercelulares variados entre os biótipos, assim como parênquima paliádico uniestratificado compactado na face abaxial da folha (Figura 2).



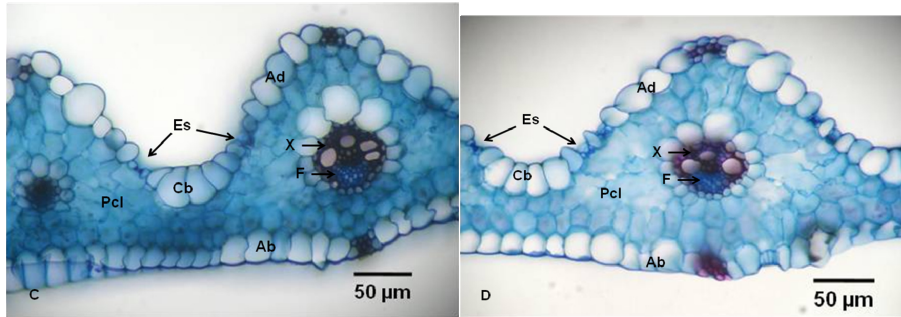


Figura 2 – Secção transversal da folha de *L. multiflorum*. A – B1S; B – B2R; C – B3R; D – B4R. Ab = epiderme abaxial; Ad = epiderme adaxial; Cb = células buliformes; Es = estômatos; Pcl = parênquima clorofiliano; Tr = tricoma; X = xilema; e F = floema. UPF, 2008.

Verifica-se que, na comparação entre as secções anatómicas, o biótipo sensível (Figura 2A) apresentou as células do mesófilo mais compactadas, dessa forma ocorrendo menor espaço intercelular, na comparação com o biótipo resistente (Figura 2B), e em consequência dessa compactação, menor quantidade de CO₂ circulante para ser utilizado na fotossíntese. Ressalta-se ainda que a existência de gases no mesófilo exerce pressão no interior da lâmina foliar, dificultando a passagem da água, e nesse caso o glifosato, de uma célula para outra, haja vista que a literatura cita a translocação do glifosato tanto via apoplasto como simplasto.

Diferem ainda pelo fato de ocorrer maior proporção de floema em relação ao xilema no biótipo sensível comparado ao biótipo resistente. Como já mencionado, o herbicida glifosato se movimenta na planta seguindo a rota dos fotoassimilados pelo floema, e assim, quanto maior a quantidade de floema, maior a possibilidade de translocação do herbicida da folha que recebeu o produto para as demais partes da planta.

Essa menor quantidade de vasos de floema também afetará a translocação da produção fotossintética da planta, no entanto, o azevém não necessita de grandes quantidades de fotoassimilados para seu desenvolvimento, haja vista que não produz frutos grandes (dreno) que demandem grande quantidade desses produtos sintetizados pela fotossíntese. Desse modo esses metabólitos permanecerão na parte aérea, garantindo grande alocação de matéria seca, nessa parte da plantas.

As raízes de azevém constituem um sistema fasciculado que, segundo Esau (1993) a primeira raiz vive apenas um curto período de tempo, e o sistema radical é formado por raízes adventícias originadas no caule. Caracterizam-se externamente, especialmente por apresentar grande quantidade de pêlos absorventes (Figura 3). Anatomicamente, verifica-se que a organização do xilema e floema nas raízes é de padrão poliarca, não ocorrendo diferenças entre o biótipo sensível e os biótipos resistentes (Figura 4).

A anatomia radical de azevém (Figura 4) segue o padrão das demais espécies da família Poaceae, ou seja, uma camada simples de células compoendo a epiderme, e nessa epiderme a presença de grande quantidade de pêlos absorventes. Internamente à epiderme encontra-se o parênquima cortical, que contém também a presença de aerênquima. Antecedendo a parte central da raiz, local onde se encontram os feixes vasculares e a medula, há uma camada de células denominada endoderme, que é caracterizada pelo seu “espessamento em U”, e mais internamente o periciclo.

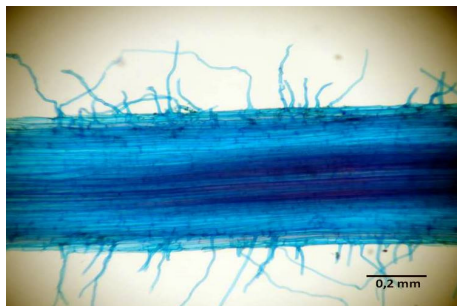


Figura 3 – Secção longitudinal da raiz de *L. multiflorum*. UPF, 2008.

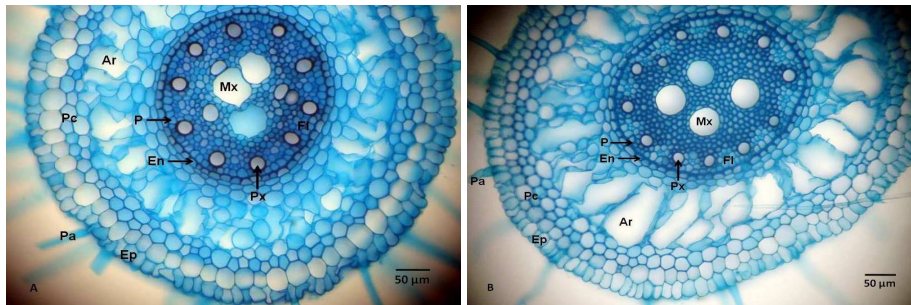


Figura 4 – Secção transversal da raiz de *L. multiflorum*. A – biótipo sensível; B – biótipo resistente. Pa = pêlo absorvente; Ep = epiderme; Pc = parênquima cortical; Ar = aerênquima; En = endoderme; P = periciclo; Px = protoxilema; Mx = metaxilema; e Fl = floema. UPF, 2008.

Comparativamente, nota-se que não ocorrem diferenças que possam conferir alguma vantagem de um biótipo em comparação ao outro. O biótipo resistente (Figura 4B) apresenta quatro vasos de metaxilema, ao passo que o biótipo sensível (Figura 4A) apenas três, porém de diâmetro maior. Quanto ao aerênquima, estrutura com especial função em plantas aquáticas, a maior quantidade dessas em plantas do biótipo sensível em relação ao resistente não resultam em efeitos que interfiram na eficiência do herbicida, uma vez que o herbicida glifosato não é absorvido pelas raízes, e sim advém da parte aérea via floema.

De acordo com as observações anatômicas realizadas, não ocorrem diferenças morfológicas claras que possam ser usadas para diferenciar o biótipo sensível dos biótipos resistentes. No entanto, verificou-se maior quantidade de espaços intercelulares no mesófilo, e menor quantidade de floema em relação ao xilema no biótipo resistente comparativamente ao biótipo sensível, que pelas suas funções na planta podem colaborar para a menor sensibilidade de alguns biótipos.

Literatura Citada

- APEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia vegetal**. Viçosa: UFV, 2003.
- BURNSIDE, O.C. Rationale for developing herbicide-resistant crops. **Weed Technology**, Champaign, v.6, n.3, p.621-625, 1992.
- CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal**. Parte II. Órgãos. Trad. Gabriella Catena. 2 ed. São Paulo: Roca, 1987.
- ESAU, K. **Anatomia das plantas com semente**. Trad. B. L. de Morretes. São Paulo: Edgard Blücher, 1993.
- FERREIRA, E.A. *et al.* Translocação do glyphosate em biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n.2, p.365-370, 2006.
- HETHERINGTON, P. *et al.* The absorption, translocation and distribution of the herbicide glyphosate in maize expressing the CP-4 transgene. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.50, n.339, p.1567-1576, 1998.
- KIRKWOOD, R.C.; MCKAY, I. Accumulation and elimination of herbicides in select crop and weed species. **Pesticide Science**, v.42, n.3, p.241-249, 1994.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- ROMAN, E.S. *et al.* Resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v.22, n.2, p.301-306, 2004.
- SATICHI, N. M. *et al.* Absorption and translocation of glyphosate isopropylamine and trimethylsulfonium salts in *Abutilon theophrasti* and *Setaria faberi*. **Weed Science**, Washington, v. 48, p.675-679, 2000.
- VARGAS, L. *et al.* Alteração das características biológicas de azevém (*Lolium multiflorum*) ocasionada pela resistência ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v.23, n.1, p.153-160, 2005.
- WANAMARTA, G.D.; PENNER, D. Foliar absorption of herbicides. **Review Weed Science**, Washington, v.4, p.215-231, 1989.