

2º PAINEL – CULTURAS RESISTENTES AOS HERBICIDAS**MODERADOR** – Robinson Pitelli, UNESP/Jaboticabal, SP**MÉTODOS DE SELEÇÃO DE CULTURAS RESISTENTES A HERBICIDAS****Luiz Carlos Federizzi¹****Introdução**

A domesticação das plantas pelas mulheres a cerca de 12000 mil anos marcou o início da agricultura. A domesticação e o cultivo das plantas como fonte de alimentos permitiram que o homem deixasse a vida nômade e se estabelecesse em locais de vida permanentes, como as vilas e cidades, podendo gastar menos tempo a procura de comida o que permitiu o rápido desenvolvimento e evolução cultural. Um dos problemas mais antigos encontrados pelos agricultores foi o controle de plantas não desejáveis que nasciam juntamente com aquelas semeadas. Portanto o controle de plantas invasoras é uma das mais antigas atividades do homem agricultor. Na agricultura moderna onde a uniformidade e qualidade dos produtos são fatores fundamentais para o sucesso, o controle das plantas daninhas tem ainda maior importância. O desenvolvimento de novas tecnologias que permitam o controle de forma mais eficiente das plantas invasoras são importantes para garantir a sustentabilidade dos agricultores e dos ambientes agrícolas.

A descoberta e introdução de genes de resistência a herbicidas nas principais culturas de importância agrícola tiveram uma rápida adoção pelos agricultores de todo o mundo e promoveram uma mudança no patamar tecnológico utilizado. Assim a seleção de genótipos resistentes aos herbicidas passou a ser um fator importante para a competitividade de todo o setor agrícola.

Várias técnicas podem ser utilizadas para o desenvolvimento de genótipos resistentes a herbicidas, desde as técnicas do melhoramento clássico até as técnicas mais recentes da biotecnologia. Portanto, este artigo tem por objetivo discutir as possibilidades das diferentes técnicas do melhoramento genético para a seleção de genótipos de espécies cultivadas resistentes a herbicidas.

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Melhoramento genético

A partir de espécies silvestres o homem obteve as espécies que hoje cultiva, as quais acumularam modificações selecionadas para o uso agrícola. Essas modificações nas plantas silvestres para tipos cultivados foi praticamente toda inconsciente e somente no final do século XVIII é que surgiu o primeiro relato escrito da eficiência da seleção (escolha) consciente de plantas com o objetivo de melhorá-las. Porém, foi no século XIX que o melhoramento de plantas mais metódico tomou impulso.

O melhoramento de plantas é a arte e a ciência de modificar geneticamente as plantas em benefício do homem. Como arte, depende da intuição e das experiências passadas que são únicas de cada indivíduo. As atividades do melhorista se parecem com as atividades dos artistas, em dúvidas, ansiedade, tensão, emoção, realização, decepção e júbilo. A passagem do conhecimento artístico se dá de forma empírica através da convivência com os melhoristas mais experientes. Como ciência, o melhoramento depende dos conhecimentos de agronomia, dos princípios da genética e de outras ciências correlatas como botânica, bioquímica, fisiologia e estatística.

As estratégias utilizadas no melhoramento são bastante simples e os elementos principais dessas estratégias são (Phoelman,1987):

1. reconhecer as características morfológicas e fisiológicas das diferentes espécies que são importantes para a adaptação, rendimento e qualidade das diferentes culturas;
2. desenhar técnicas que permitam avaliar o potencial para as características de importância nas diferentes populações e genótipos;
3. procurar novas fontes de genes para as características desejadas;
4. desenvolver meios para combinar as características desejáveis em genótipos com potencial para ser uma nova variedade;

Por outro lado as técnicas utilizadas são bem conhecidas e estão todas direcionadas para a identificação, criação e recombinação da variabilidade presente na espécie de interesse. As técnicas podem ser diferenciadas quanto a utilização ou não da reprodução sexual e foram descritas por Paterniani (2002) como :

- 1.Com reprodução sexual
 - seleção – intra e interpopulacional
 - hibridação – intra e interespecifica
 - heterose – vigor híbrido

2. Sem reprodução sexual :

ploidia- alterações no número de cromossomos

mutagenese – indução artificial de mutações

variação somaclonal – reprodução de indivíduos a partir de células somáticas

hibridação somática – fusão de protoplastos

cibridos–citoplasma e organelas da espécie A e núcleo da espécie B

transgenia – transferência de genes exógenos

transplastomia – transferência de plastídeos exógenos

Destas técnicas aquelas com maior potencial e importância para a obtenção de plantas cultivadas resistentes a herbicidas serão abordados com mais detalhe a seguir.

Métodos para a obtenção de plantas resistentes a herbicidas

Neste trabalho uma planta suscetível é definida como aquela em que o produto aplicado causa alterações no seu crescimento e desenvolvimento e na maioria das vezes o efeito é tão pronunciado que leva a planta a morte. Uma planta é chamada resistente quando mantém seu crescimento e desenvolvimento mesmo quando foram aplicadas doses do produto bem mais altas das usadas comercialmente . Plantas resistentes podem revelar efeitos temporários que após algum tempo desaparecem. A resistência tratada neste trabalho é aquela devida a presença de genes nucleares ou dos cloroplastos , que é estável e transferida para as progênie nas próximas gerações.

1. Seleção dentro da variabilidade existente

Desde os primórdios da agricultura que o homem tem selecionado tipo diferentes que apareceram com o decorrer do desenvolvimento das populações. As mutações espontâneas são as fontes primárias de variabilidade genética e a recombinação de diferentes mutantes são a causa do aparecimento de novos genótipos. Portanto é possível que dentro da espécie de interesse existam genótipos que tenham já resistência a algum herbicida específico. Trabalhos em que ocorreram erros, com a aplicação de herbicidas sobre espécies cultivadas demonstraram que genótipos apresentaram diferenças quanto a resposta ao herbicida aplicado. Estes trabalhos demonstraram que mesmo sendo os produtos químicos de origem recente , pelo menos para alguns compostos já existiam mutações espontâneas para a resistência nos genótipos dentro das espécies cultivadas.

O primeiro passo para a identificação de genótipos resistentes é o teste de um grande número (milhares) de genótipos da espécie cultivada. Para isso são semeados em laboratório ou a campo uma pequena amostra

de cada genótipo fixo e sobre eles é aplicado o herbicida no estágio de plântula ou de planta adulta. Alguns genótipos podem ser resistentes e não apresentarão qualquer injúria com a aplicação do herbicida. Por outro lado, é possível que para alguns herbicidas não sobrevivam nenhuma planta, isto significa que não há variabilidade para a característica na espécie cultivada, e sem variabilidade não é possível ter progresso genético e selecionar plantas resistentes. Uma fonte importante de genótipos são os bancos de germoplasma, onde uma grande coleção de cultivares antigas e selecionados nos mais diferentes ambientes são mantidos e conservados. Para aquelas espécies que apresentam uma série poliplóide com aveia, trigo e brassicas é possível testar os diferentes genótipos nos diferentes níveis de ploidia e se identificado genes de resistência estes podem ser passados para as variedades adaptadas pelos métodos convencionais de cruzamento e retrocruzamentos.

Se não existir genes de resistência nos genótipos cultivados nem naqueles próximos é possível tentar identificar em espécies silvestres ou daninhas aparentadas genes de resistência a herbicidas. Uma vez identificados, genes de resistência, estes podem ser transferidos através das técnicas do melhoramento clássicos para as variedades convencionais. A grande maioria das mutações espontâneas são em um único ou poucos genes que podem ser facilmente introduzidos em genótipos com bom potencial agrônômico.

O grande problema da busca de mutantes espontâneos é o grande número de genótipos que tem que ser testados, e pode não existir variabilidade para o herbicida específico o que impediria qualquer progresso na obtenção de plantas resistentes. Outro ponto importante é o tempo necessário para testar um grande número de genótipos, e o rápido desenvolvimento de outras técnicas de obtenção de plantas resistentes a herbicidas.

As mutações discutidas até aqui são aquelas com grande efeito no fenótipo, mas é possível que exista variabilidade com genes de pequeno efeito dispersos nos diferentes genótipos da população. Pode ser que para algum herbicida específico existam genes de pequeno efeito que isoladamente não garantam resistência ao genótipo, mas pela seleção especialmente seleção recorrente é possível juntar num mesmo genótipo muitos genes com pequeno efeito que podem garantir resistência suficiente para ser utilizada no campo.

2. Indução de variabilidade

Quando não são encontrados mutantes espontâneos existem técnicas que permitem aumentar a variabilidade genética dentro da espécie cultivada. O aparecimento de mutantes pode ser potencializado pela aplicação de um agente mutagênico. Normalmente são utilizadas radiações

ionizantes e diferentes produtos químicos. As técnicas de cultura de células e tecidos também tem gerado um grande número de variantes chamados variantes somaclonais. A freqüência que os genes mutam varia bastante e por causa do sistema de reparo do DNA, para alguns genes a freqüência de mutantes pode ser muito baixa.

Uma das formas mais tradicionais de produzir mutantes é através da aplicação de agentes mutagênicos em sementes. Milhões de sementes são submetidas ao agente mutagenico e após é realizado um teste para a identificação dos mutantes desejados. Exemplos da aplicação desta técnica foi a obtenção de plantas de arroz resistentes aos herbicidas do grupo imidazolinonas (Menezes e Ramirez, 2002). A resistência aos herbicidas é uma das formas mais fáceis de selecionar os tipos resistentes, pois basta a aplicação do herbicida e as plantas que sobreviverem serão as resistentes. Entretanto, é bem provável que o tipo mais freqüente de mutante vai ser similar ou nos mesmos genes que ocorrem com maior freqüência nas mutações espontâneas.

Para aumentar a probabilidade dos mutantes desejados após a aplicação do agente mutagenico, as sementes podem ser colocadas a germinar com o herbicida específico e após fazer sua aplicação direta sobre as plântulas e selecionar as que apresentam resistência. Exemplo deste tipo de trabalho foi realizado com trigo, por (Shaner et al. 1996) onde a mutagenese e a seleção foi realizada em 4 etapas distintas: 1. Tratamento de 5000 sementes com mutagênico químico (Azida sódica); 2. Sementes forma embebidas com herbicida 25 ml/l de 1 M imazethapyr por 3 dias; 3. Foi realizada irrigação e pulverização com 300g ha⁻¹ do mesmo herbicida; 4. Sementes que emergiram em até 4 semanas foram transplantadas para solo normal. Dum total de 120 000 plântulas testadas somente 4 foram resistentes (gene semidominante). Por outro lado, a aplicação de agente mutagênico em mais de um milhão de sementes de *A. thaliana* não apresentou nenhuma planta resistente ao glifosato. Já para grama (turf grass) vários ciclos de seleção seqüencial apresentaram plantas com resistência até 4 vezes aquele das plantas não selecionadas.

Alguns autores sugeriram a aplicação do agente mutagenico em grãos de pólen onde teoricamente seria mais provável a obtenção de mutantes, pois trata-se de tecido haplóide. Em milho pendões foram cortados dez dias antes da antese e colocados em meio liquido com e sem 40 mg/l de chlorsulfuron e o pólen apos foi utilizado para polinizar uma linhagem com genótipo conhecido. As sementes resultantes foram semeadas em casa de vegetação e pulverizados com chlorsulfuron (23 g/ha). Foi possível separar o pólen provenientes das plantas resistentes daquelas não resistentes ao herbicida (Frascaroli e Songstad, 2001).

A grande vantagem deste método é que pode ser aplicado em laboratório, utilizando pequeno espaço, sendo possível selecionar um

grande número de indivíduos, podendo ser aplicado diferentes agentes mutagênicos em uma única vez ou em forma seqüencial. Para cada espécie de planta e agente mutagênico existe uma dose ideal a ser aplicada. Por outro lado, as mutações provocadas são ao acaso e pode não ser atingida a parte do DNA que carrega os genes potenciais de resistência. Ainda é possível que ocorram várias mutações simultâneas afetando outras características desejadas.

3. Variação somaclonal

A cultura de células e tecidos em meios apropriados tem sido uma fonte importante de variantes. Quando as células são desorganizadas na forma de calo pode ocorrer uma reorganização do genoma, provocando o aparecimento de variabilidade genética que pode ser selecionada e transmitida para as progênies. As partes da planta utilizadas na cultura de tecidos são chamados explantes e que podem variar conforme a espécie. A freqüência de mutantes obtidos desta forma é bem mais alta que as demais, mas varia bastante entre as diferentes espécies de plantas. Também é possível selecionar para resistência 'in vitro', pela aplicação do agente seletivo no meio de cultura, assim é possível selecionar calos resistentes a determinado herbicida pela aplicação do mesmo no meio de cultura. Exemplos da utilização da variabilidade obtida pela variação somaclonal são a seleção de linhas de fumo, soja e linho resistentes a sulfonyluréis. Em calos de milho cultivados na presença do herbicida imidazolinone foram regeneradas varias linhas resistentes sendo que a resistência foi devida a um ou dois genes dominantes que foram depois introduzidos por sucessivos retrocruzamentos para linhas endogâmicas com bom potencial agrônomico.

O método tem uma limitação que não pode ser empregado em espécies, e dentro das espécies genótipos que são recalcitrantes e não podem ser regeneradas 'in vitro'. Normalmente aparecem grande variação em muitos caracteres que nem sempre são na direção desejada pelo melhorista. A probabilidade de aparecer mutantes para o caráter desejado vai depender da freqüência de mutação no gene, alguns genes apresentam uma freqüência muita alta de mutantes quando as plantas são regeneradas 'in vitro'.

4. Fusão de protoplastos

A fusão de células somáticas de duas espécies diferentes pode gerar plantas regeneradas e férteis, especialmente quando o cruzamento sexual é difícil de realizar. Também é possível aplicar no meio de regenerar o agente seletivo no caso um herbicida e obter plantas resistentes. Esta técnica também oferece a possibilidade de realizar cruzamentos interespecíficos de espécies distantes e portanto a transferência dos genes

de resistência de uma espécie para outra. A principal dificuldade é a de obter protoplastos que possam ser regenerados em plantas e que estes sejam férteis.

5. Transformação

Com a descoberta dos mecanismos de transferência de genes entre espécies diferentes se abriram novas possibilidades na seleção de plantas resistentes a herbicidas. A obtenção de plantas transgênicas com resistência a herbicidas tem sido muito importante no final dos anos noventa. Neste ano pela primeira vez vai ser plantada mais soja transgênica resistente ao herbicida do que a não transgênica (James,2002). O sucesso da adoção desta tecnologia pelos produtores despertou um grande número de trabalhos tentando identificar em bactérias e fungos genes que possam determinar resistência a herbicidas com base em um dos seguintes mecanismos: 1. alteração no sítio alvo do herbicida; 2. genes que possam detoxificar o herbicida; 3. previna o herbicida de chegar no alvo de ação; 4.superexpressar uma enzima que se sobreponha ao efeito do herbicida. Resistência a bromoxynil em Canola, incorporação do gene oxy tirado de uma bactéria de solo que confere a habilidade de metabolizar este grupo de herbicidas (Cuthbert et al., 2001).

A inclusão e expressão da fosfinotricina acetyltransferase em tecidos de plantas de melão, melancia, pepino e moranga proporcionou resistência ao herbicida glufosinate Shibolet et al. 2001). Como método de introdução foi utilizado como vetor um potyvirus.

A tendência atual é a de aumentar o número de genes clonados de diferentes organismos que possam ser transferidos através da biologia molecular para as plantas e aumentar muito nosso conhecimento das diferenças moleculares entre alelos resistentes e susceptíveis aos herbicidas. Comparação nas seqüências de aminoácidos revelaram que uma simples substituição de isoleucina por leucina discrimina a Acetil Coenzima A Carboxilase (ACCCase) resistente e sensível ao herbicida sethoxydim (Deile, Wang e Darmency, 2002). Também uma simples substituição de uma base e o correspondente aminoácido (troca da teonina por isoleucina) num gene (- tubulina) que diferencia algumas plantas resistentes e suscetíveis ao herbicida trifluralina (Anthony et al.,1998).

Uma forma também possível de obter mutantes é a utilização das técnicas da biologia molecular para eliminação de características específicas da planta pela inibição ou supressão da expressão gênica. Normalmente é utilizada mRNA sintetizado da fita não codificadora do DNA, chamada de antisense que modifica a expressão do gene podendo mudar completamente uma característica. Exemplo foi a obtenção de tomate longa vida. Pode ser obtido uma planta resistente ao herbicida pela alteração no sítio de atuação do herbicida.

Modificações de cloroplastos e mitocôndrias: Uma célula de uma planta pode conter mais de 100 cloroplastos e cada um pode ter mais de 900 cópias do DNA. Devido ao grande número de cópias do DNA os cloroplastos podem conter altos níveis de proteína externa. Outras vantagens são que ao contrário das outras formas de obtenção de plantas transgênicas, a inserção de genes é feita sempre no mesmo local. Como estas organelas possuem material genético, estes podem trazer genes de resistência a herbicidas e também podem ser inseridos genes que possam trazer variabilidade para a resistência aos herbicidas nas espécies cultivadas. A introdução de genes nas organelas permite diminuir um dos problemas de plantas transgênicas que é a dispersão de pólen para plantas indesejadas causando poluição genética, uma vez que o material genético das organelas tem herança materna, não é transmitida pelo pólen. Exemplo de transformação de cloroplasto para vários caracteres e também para a resistência aos herbicidas glifosato e bialaphos foram reportados por Daniell et al. (2002).

6. Efeitos pleiotrópicos

Quando da incorporação dos genes de resistência aos herbicidas é possível que ocorram modificações em outras características da planta, ou seja pode ocorrer uma forma de penalidade pela incorporação dos genes de resistência. Entretanto, estas penalidades não estão associados ao método de introdução do gene de resistência, mas pelas peculiaridades dos mecanismos de resistência a herbicidas do gene incorporado.

7. Considerações finais

O número de plantas cultivadas resistentes aos herbicidas é bastante grande e abrange resistência a grande maioria dos compostos utilizados na agricultura. A utilização na agricultura com grande sucesso de plantas transgênicas resistentes os herbicidas totais aumentou o interesse e o número de pesquisas visando a obtenção de plantas resistentes aos mais diversos compostos. Por outro lado o desenvolvimento de técnicas de transgenia mais seguras do ponto de vista ambiental, como a utilização da transformação de cloroplastos abrem novas perspectivas para a larga utilização deste tipo de resistência na agricultura do terceiro milênio. No Brasil há claramente um divórcio grande dos melhoristas e pesquisadores da área de plantas daninhas prejudicando desta forma o desenvolvimento de pesquisas mais consistentes nesta área. Esta mais que na hora de juntar estas duas áreas de tanta importância em equipes multidisciplinares para a realização de trabalhos conjuntos envolvendo os principais compostos e culturas de interesse nacionais.

Bibliografia Consultada

Anthony, R.G.; Waldin, T.R.; Ray, J.A.; Bright, S.W.J.; Hussey, P.J. 1998. Herbicide resistance caused by spontaneous mutation of the cytoskeletal protein tubulin. *Nature* 393, 260-263.

Cuthbert, J.L.; McVetty, P.B.E.; Freyssinet, G.; Freyssinet, M. 2001. Comparison of the performance of bromoxynil-resistant and susceptible near-isogenic populations of oilseed rape. *Canadian Journal of Plant Science* 81: (3) 367-372.

Daniell, H.; Khan, M.S.; Allison, L. 2002. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends in Plant Science* 7 (2): 84-91

Deley, C.; Wang, T.Y.; Darmency, H. 2002. An isoleucine-leucine substitution in chloroplastic acetyl-CoA carboxylase from green foxtail (*Setaria viridis* L. Beauv.) is responsible for resistance to the cyclohexanedione herbicide sethoxydim. *Planta* 214: (3) 421-427.

Frascaroli, E.; Songstad, D.D.; 2001. Pollen genotype for a simply inherited qualitative factor determining resistance to chlorsulfuron in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 102 : (2-3) 342-346.

James, C. ;2002. Global Review of Commercialized Transgenic Crops: 2001. ISAAA Briefs n. 24. Preview. www.isaaa.org acessado em 22/01/2002.

Menezes, V.G.; Ramirez, H. 2002. Controle de arroz vermelho e de outras plantas daninhas em arroz irrigado com herbicidas Bas 68800 H (Imidazolinona) e sua seletividade às plantas de arroz. In: Seminário do Arroz Irrigado- uso intensivo e sustentável de varzeas. Santa Maria 4 a 5 de junho de 2002, p.92-100.

Paterniani, E.; 2002 Uma percepção crítica sobre técnicas de manipulação genética. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* (no prelo).

Poehlman, J.M. 1987. *Breeding Field Crops*. Van Nostrand Reinhold Company Inc., Westport, USA ,p.724.

Shaner, D. Bascomb, N.F.; Smith, W. 1996. Imidazolinone-resistant crops: selection, characterization and Management. In : Ed. Duke, S.O. Herbicide Resistant Crops : Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects. CRC Press, Inc. p.143-157.

Shiboleth, Y.M.; Arazi, T.; Wang, Y.Z.; Gal-On, A. 2001. A new approach for weed control in a cucurbit field employing an attenuated potyvirus-vector for herbicide resistance. Journal of Biotechnology 92: 37-46.