

CONTAGEM CROMOSSÔMICA DE BIÓTIPOS DE AZEVÉM SUSCETÍVEL E RESISTENTES AO HERBICIDA GLYPHOSATE

SANDRO ROBERTO PIESANTI¹; QUELI RUCHEL²; JESSICA DIAS GOMES³;
VERA LÚCIA BOBROWSKI⁴; LEANDRO VARGAS⁵; DIRCEU AGOSTINETTO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – sandropiesanti@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – queli.ruchel@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – jessicadiasgomes@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – vera.bobrowski@gmail.com

⁵Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Trigo) - vargas@cnpt.embrapa.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – agostinnetto@ig.com.br

1. INTRODUÇÃO

O azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) é uma Poaceae anual, de fecundação cruzada, com ciclo anual, adaptada a diversas condições ambientais (KISSMANN, 1999). É amplamente utilizada como forrageira em regiões de clima temperado, sendo considerada importante planta daninha competidora em lavouras de trigo no Brasil, devido às semelhanças entre as duas espécies (RADOSEVICH et al., 1997).

Buscando maior eficiência na produção de forragem e maior cobertura morta para implantação do sistema de semeadura direta, novos genótipos de azevém estão sendo avaliados. O azevém possui genótipo diploide, com $2n=14$ cromossomos (PEREIRA, 2012), entretanto, melhoristas desenvolveram os tetraploides com $4n=28$ cromossomos (OLIVEIRA, 2013).

O controle do azevém para formação de palhada no sistema de semeadura direta e em pomares é realizado quase na sua totalidade, com a aplicação de herbicidas não seletivos, sendo o glyphosate o herbicida mais utilizado (CHRISTOFFOLETI; LOPEZ-OVEJERO, 2003), devido à sua alta eficiência e ao custo relativamente baixo. Contudo, a sua utilização de forma intensa em mesma área, traz como consequência, vários casos de resistência a esse mecanismo de ação (FERREIRA et al., 2008).

Há relatos que o azevém diploide apresenta suscetibilidade diferencial ao herbicida glyphosate, porém o tetraploide se mostra mais tolerante (DORS et al., 2010). Ainda, segundo o autor, o estágio fenológico de desenvolvimento das plantas pode afetar o grau de tolerância ao glyphosate em ambos os genótipos. Dessa forma, esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de adequar a metodologia para contagem de cromossomos de biótipos de *Lolium multiflorum* Lam.

2. METODOLOGIA

Realizou-se experimento no período de setembro a dezembro de 2013, no Laboratório de Genética do Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética do Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

Para a adequação da metodologia para a análise citológica de cromossomos mitóticos, sementes de azevém foram colocadas para germinar distribuídas de modo uniforme sobre duas folhas de papel germitest, umedecidas com 5mL de água e mantidas em B.O.D. a $25\pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12h de luz. Coletou-se a parte aérea das plântulas com 3cm de comprimento e as raízes com 0,5cm; 1cm; 1,5cm; e, 3cm de comprimento, para análise do estágio dos meristemas que apresentassem

maior número de células em divisão, facilitando assim a análise citológica e então fixado em álcool absoluto e ácido acético glacial 3:1 (fixador de Carnoy I), à temperatura ambiente, por 2h, sendo posteriormente armazenado, em álcool 70%, a $6\pm 2^\circ\text{C}$, até a preparação das lâminas.

Após esse procedimento, estabeleceu-se o processo de amaciamento da parede celular (hidrólise) com HCl 5N, em temperatura ambiente por 5, 10, 15 e 20min e, posteriormente, testou-se os corantes para lâminas temporárias;orceína acética 2% e carmim acético 1%, para visualização dos cromossomos.

Após a determinação do tamanho da raiz a ser utilizada, do tempo de hidrólise e do corante, testou-se diferentes tempos de exposição ao agente antimitótico (8-hidroxiquinoleína - 8 HQ) (PAULA, 2009), a molaridade de 0,02M, sendo mantida as raízes imersas no mesmo por 2, 5, 14 e 24h a 4°C .

Para o preparo das lâminas, as pontas de raiz foram retiradas do fixador e lavadas três vezes em água destilada, por cerca de 30s, sendo submetidas ao processo de amaciamento da parede celular e, novamente, lavado em água destilada. Posteriormente, o meristema radicular foi retirado, com auxílio de agulhas histológicas e microscópio estereoscópico, sendo colocado sobre a lâmina e esmagado com uma gota de corante e bastão de vidro. Posteriormente, a lâmina foi aquecida sobre a chama de lamparina, e o material prensado entre lâmina e lamínula com microprensa. A análise cromossômica foi realizada em microscópio ótico, com objetiva de 40 e 100X, utilizando-se o método de varredura, partindo do canto inferior direito da lâmina.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para análise cromossômica mitótica, a maior quantidade de células em divisão mitótica é encontrada no tecido meristemático (meristemas de raízes, brotos foliares, anteras, paredes de ovário, gavinhas e pétalas) (GUERRA & SOUZA, 2002). Esse tecido pode ser encontrado em diferentes órgãos das plantas e caracteriza-se por não apresentar células diferenciadas. Para a análise citogenética deste trabalho, o comprimento ideal de raiz testado para as análises foi o de 1,5cm, pois as células possuem maior volume celular e têm crescimento muito rápido. Além disso, as pontas das raízes absorvem facilmente as soluções onde são mergulhadas, o que é importante no uso de antimitóticos e fixadores.

Os agentes mais comumente utilizados para inibir a divisão celular em tecidos meristemáticos, espalhar os cromossomos e provocar a contração uniforme dos braços cromossômicos são a colchicina 0,01 a 0,5%, 8-hidroxiquinoleína (8HQ) 0,002M e soluções saturadas de paradiclorobenzeno (PDB) ou α -bromonaftaleno. O tempo ideal de tratamento com esses produtos pode variar com a espécie, dependendo, principalmente, da temperatura e da concentração utilizadas (GUERRA & SOUZA, 2002).

As substâncias antimitóticas utilizadas atuam inibindo a formação do fuso e espalhando os cromossomos na célula, provocando sincronização celular e aumentando o número de metáfases, permitindo melhor visualização dos cromossomos e das constrições primárias e secundárias e, conseqüentemente, melhor definição da morfologia cromossômica, aumentando a viscosidade do citoplasma e facilitando a rápida penetração dos fixadores pela remoção de depósitos indesejáveis nos tecidos (SINGH, 2000).

O protocolo básico que apresentou os melhores resultados na obtenção de cromossomos de *Lolium multiflorum* Lam. foi: (1) seleção das sementes viáveis; (2)

germinação das sementes a 25°C, com 12h de luz, por 2 a 7 dias; (3) coleta das pontas do meristema apical radicular nítido (desprovido de raízes secundárias) com 1,5cm de comprimento ou da parte aérea; (4) pré-tratamento em 8-HQ 0,002M por 24h, a 4±1°C; (5) fixar o material em álcool absoluto e ácido acético glacial 3:1 (fixador de Carnoy I), à temperatura ambiente; (6) armazenar em álcool 70%, a 4-6°C até a preparação das lâminas; (7) lavar as pontas de raiz ou parte aérea em água destilada, três vezes; (8) hidrolisar em HCl 5N por 20min, à temperatura ambiente; (9) lavar o material em água destilada, três vezes; (10) retirar e esmagar o material vegetal com uma gota de coranteorceína acética 2%; (11) cobrir o material com lamínula e pressionar com lápis borracha; (12) aquecer, brevemente, a lâmina sobre a chama de lamparina; (13) prensar o preparado utilizando microprensa; e, (14) analisar em microscópio (Fig.1A-D).

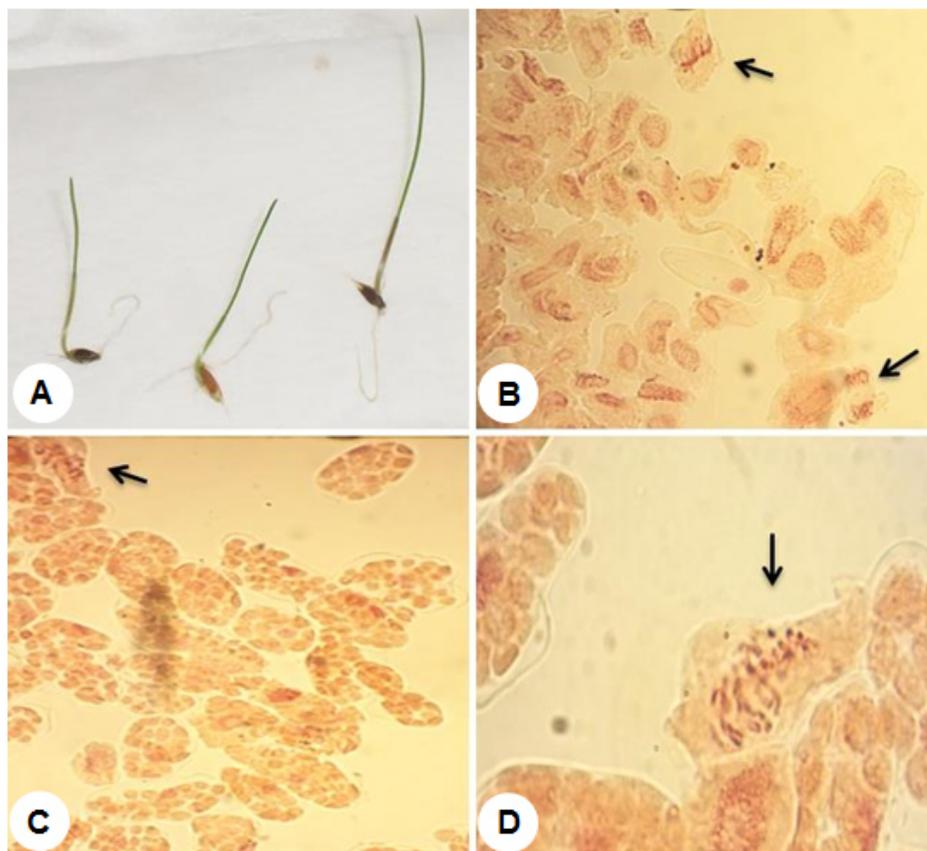


Figura 1 – Plântulas (A), células meristemáticas radiculares com diferentes fases de divisão mitótica (B) e células da parte aérea (C e D) de azevém (*Lolium multiflorum*). DEZG, IB/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2013. Setas = indicam as células com cromossomos visíveis.

Dessa forma, os resultados obtidos poderão servir como base para outros trabalhos que envolvem o gênero *Lolium*, podendo-se associar informações tanto morfológicas, citogenéticas, quanto moleculares, chegando a consenso de quais espécies estão presentes no Brasil, principalmente em áreas agrícolas competindo com as culturas, bem como espécies são nativas, introduzidas ou selecionadas pelo uso de herbicidas.

4. CONCLUSÃO

A melhor nitidez dos cromossomos na análise citológica dos biótipos de *Lolium multiflorum* é obtida utilizando raízes com 1,5cm de comprimento e aumentando o tempo de hidrólise e de exposição ao agente antimitóticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Principais aspectos da resistência de plantas daninhas ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v.21, p.507-515, 2003.
- DORS, C.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; SANCHOTENE, D.M.; DIAS, A.C.R. MANFRON, P.A.; DORNELLES, S.H.B. Suscetibilidade de genótipos de *Lolium multiflorum* ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v.28, p.401-410, 2010.
- FERREIRA, E.A.; CONCENÇO, G.; SILVA, A.A.; REIS, M.R.; VARGAS, L.; VIANA, R.G.; GUIMARÃES, A.A.; GALON, L. Potencial competitivo de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*). **Planta Daninha**, v.26, p.261-269, 2008.
- GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; CARROLL, S.B.; DOEBLEY, J. **Introdução à Genética**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 710p.
- GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como analisar cromossomos**: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: Funcep, 2002. 131p.
- KISSMANN, K. G. **Plantas infestantes e nocivas**. 2.ed. São Paulo, 1999. 976p.
- OLIVEIRA, Lucas Vargas. **Características morfogênicas e estruturais de azevém**. 2013. 65f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- PAULA, Juliana Maria de. **Caracterização e manejo de *Conyza* spp. resistente ao herbicida glifosato**. 2009. 70f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- PEREIRA, R.C.; DAVIDE, L.C.; TECHIO, V.H.; TIMBÓ, A.L.O. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. **Ciência Rural**, v.42, p.1278-1285, 2012.
- RADOSEVICH, S. et al. **Weed ecology: implications for vegetation management**. 2.ed. New York: Willey, 1997. 589 p.
- SINGH, N.P. A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. **Experimental Cell Research**, v.256, p.328-337, 2000.