

VIABILIDADE POLÍNICA DE BIÓTIPOS DE AZEVÉM SUSCETÍVEL E RESISTENTES AO HERBICIDA GLYPHOSATE

**JESSICA DIAS GOMES DA SILVA¹; QUELI RUCHEL²; LEANDRO VARGAS³;
VERA LÚCIA BOBROWSKI⁴; SANDRO PIESANTI⁵; DIRCEU AGOSTINETTO⁶**

¹*Universidade Federal de Pelotas – jessicadiasgomes@hotmail.com*

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

³*Embrapa Trigo – CNPT – leandro.vargas@embrapa.br*

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

⁵*Universidade Federal de Pelotas – sandropiesanti@yahoo.com.br*

⁶*Universidade Federal de Pelotas – agostinetto@ig.com.br*

1. INTRODUÇÃO

Lolium multiflorum L. (azevém) é uma espécie monocotiledônea anual, alógama, adaptada a diversos tipos de solo, sendo altamente produtiva em solos férteis, onde suporta pastoreio intenso e apresenta rebrote com grande número de afilhos (CARÁMBULA, 2007). A espécie é de fácil dispersão e, por isso, está presente e caracteriza-se como importante planta daninha em culturas como trigo, soja e pomares na região Sul do Brasil (ROMAN et al., 2004).

O controle do azevém tem sido realizado, quase na sua totalidade, com a aplicação de herbicidas não seletivos, especialmente o herbicida glyphosate. Porém, tem sido verificado dificuldade no controle do azevém com o herbicida glyphosate, em função da ocorrência de biótipos resistentes.

Considerando que a manifestação do genótipo de um indivíduo é o resultado da contribuição dos gametas masculino e feminino, quanto maior a viabilidade polínica, maior a possibilidade da formação de diferentes combinações entre alelos, aumentando a variabilidade genética (SOUZA; PEREIRA; MARTINS, 2002). A herança da resistência ao glyphosate em azevém é do tipo nuclear, com disseminação rápida na população, via pólen (VARGAS; MORAES; BERTO, 2007). Segundo Wang et al. (2004), gramíneas de polinização cruzada, como o azevém, têm elevado potencial de passar seus genes às plantas adjacentes, podendo aumentar a variabilidade na população e a frequência de indivíduos resistentes ao longo do tempo. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi indicar corantes para testes de viabilidade polínica de biótipos de azevém suscetível e resistentes ao herbicida glyphosate.

2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado 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 os testes de viabilidade do pólen, o delineamento experimental foi o completamente casualizado, com quatro repetições. Os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial, onde fator A testou os biótipos de azevém (SVA 1, SVA 2, SVA 4 e PFU 5); o fator B avaliou diferentes corantes (azul de tripan, azul de amâ, orceína acética 2%, carmim acético 1% e carmim propiônico 1%); e, o fator C constou de pólen fresco ou fixado. Contou-se 100 grãos de pólen por lâmina, sendo cada lâmina considerada como uma repetição.

Coletaram-se, de forma aleatória, dez inflorescências de cada biótipo logo após a antese, transportando-as para o laboratório em placas de Petri fechadas. No laboratório, as inflorescências foram imersas em fixador Carnoy 3:1 (etanol:

ácido acético) e mantidos em temperatura ambiente por 2h. Depois, o material foi transferido para o álcool 70% e armazenado em temperatura $6\pm2^{\circ}\text{C}$, até o preparo das lâminas.

O material foi colocado sobre lâmina, retirando-se da inflorescência dez anteras, que foram seccionadas para a liberação dos grãos de pólen. Em seguida, foi adicionada uma gota do corante a ser testado e cobria-se o material com lamínula, após 10min preparou-se quatro lâminas por tratamento, sendo contados 100 pólens/lâmina em microscópio óptico com objetiva de aumento de 40x.

Consideraram-se viáveis os grãos de pólen que apresentaram a exina intacta, com protoplasma bem corado e com distribuição homogênea; e, inviáveis aqueles que possuíam tamanho anormal, coloração fraca e/ou protoplasma reduzido ou ausente para a maioria dos corantes testados, exceto para o azul de tripan onde os pólens viáveis não permitem a entrada do corante.

Os dados foram analisados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk), com posterior análise da variância ($p\leq0,05$). Quando foi observada significância estatística, as médias dos fatores bióticos, corantes e pólen fresco ou fixado foram comparados pelo teste de Duncan ($p\leq0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve interação tripla para os fatores avaliados. Verificou-se interação entre os fatores bióticos e corantes utilizados, enquanto para o fator pólen fresco ou fixado, não se observou significância (Tabela 1). Analisando-se a utilização do corante azul de amã na viabilidade do pólen fresco, observou-se que, o biótipo PFU 5 apresentou redução de cerca de 30%, em comparação ao SVA 2 (Tabela 1). O azul de amã indica a viabilidade do pólen pela coloração azul (JOHANSEN, 1940).

O corante azul de tripan estimou cerca de 75% a mais de viabilidade polínica para SVA 2, comparado ao SVA 1 (Tabela 1). Este corante indica a viabilidade do pólen pela coloração translúcida, ou seja, o corante não penetra no pólen viável, enquanto que, os pólens de coloração azul escura são inviáveis (GOZLEKCI; KAYNAK, 2000).

Para o carmim acético, o biótipo SVA 2 mostrou entorno de 20% de perda de viabilidade, respectivamente, em relação ao SVA 1. Esse corante indica a viabilidade pela coloração vermelha, pela reação com o material genético da célula (DNA) (KEARNS; INOUYE, 1993).

Avaliando-se o corante carmim propiônico, que indica a viabilidade do pólen pela coloração vermelha, o SVA 2 demonstra cerca de 20% a mais de pólens frescos viáveis do que o biótipo PFU 5. Entretanto, PFU 5 apresentou aproximadamente 10% a mais de pólens viáveis, comparado ao SVA 2, usando-se o corante orceína acética (Tabela 1). Em trabalho avaliando-se dez genótipos de *Lolium multiflorum* Lam., utilizando o corante carmim propiônico, verificou-se alta taxa de viabilidade polínica, superior a 89% (NUNES et al., 2012).

Comparando-se os diferentes corantes utilizados para o biótipo SVA 2, o carmim propiônico indicou maior viabilidade polínica quando comparado aos demais corantes, com cerca de 90% de pólens frescos viáveis (Tabela 1). Para SVA 1, o corante azul de tripan indicou redução de aproximadamente 95% da viabilidade do pólen fresco, comparado ao carmim acético. No corante carmim acético verificou-se cerca de 90% de viabilidade para o biótipo SVA 4. Entretanto, em PFU 5 o corante que demonstrou maior viabilidade do pólen foi a orceína acética, com valores próximos a 95% de viabilidade.

Tabela 1 – Viabilidade (%) do pólen fresco e fixado de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) suscetível (SVA 2) e resistente (SVA 1, SVA 4 e PFU 5) ao herbicida glyphosate, em função de diferentes corantes. DEZG, IB/UFPel, Capão do Leão/RS, 2013.

Corantes	Biótipos							
	SVA 2 (S) ¹		SVA 1 (R)		SVA 4 (R)		PFU 5 (R)	
	Viabilidade do pólen fresco (%)							
Azul de amã	87,7	a ² A ²	80,7	a B	85,8	a B	63,0	b C
Azul de tripan	21,0	a C	5,2	c C	13,7	b C	17,7	ab D
Carmim acético	77,7	b B	94,8	a A	90,5	a A	87,8	ab AB
Carmim propiônico	90,8	a A	82,5	ab B	87,5	a AB	73,7	b BC
Orceína acética	82,0	b AB	90,8	a A	84,0	b B	93,0	a A
C.V. (%)	7,34							
Viabilidade do pólen fixado (%)								
Azul de amã	90,3	a CB	67,3	b B	89,0	a A	74,3	b C
Azul de tripan	6,7	b D	30,0	a C	17,0	ab C	5,7	b D
Carmim acético	94,3	a A	97,0	a A	91,3	ab A	85,0	b AB
Carmim propiônico	87,8	b C	80,3	c AB	85,0	bc B	94,7	a A
Orceína acética	93,0	a AB	94,3	a A	84,3	b B	82,0	b BC
C.V. (%)	9,22							

¹ Suscetível (S) e resistente (R). ² Médias seguidas pela mesma letra nas linhas (minúscula) e nas colunas (maiúsculas), não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

O PFU 5 apresentou aproximadamente 93% de pólens viáveis quando utilizado o corante orceína acética. A orceína acética indica a viabilidade do pólen pela coloração vermelha (BIONDO; BATTISTIN, 2001).

No estudo da viabilidade do pólen fixado, utilizando-se o corante azul de amã, observou-se que, o biótipo SVA 2 apresentou cerca de 90% de pólens viáveis (Tabela 1). O biótipo PFU 5 demonstrou cerca de 80% a menos de pólens viáveis fixados, comparado ao SVA 1, utilizando-se azul de tripan. Para os corantes carmim acético e orceína acética, SVA 1 mostrou em média, aproximadamente 15% de redução da viabilidade, em relação ao PFU 5. Avaliando-se o corante carmim propiônico, PFU 5 demonstrou cerca de 80% de pólens fixados viáveis.

Para SVA 2, SVA 1 e SVA 4, o corante carmim acético apresentou melhor desempenho que os demais corantes, com mais de 90% de pólens fixados viáveis para os três biótipos (Tabela 1). Em PFU 5, observou-se valor próximo a 95% de viabilidade para o corante carmim propiônico. O carmim propiônico é amplamente utilizado em análises de rotina, no entanto, ele pode ser inadequado para algumas espécies que possuem a exina do grão de pólen grossa, havendo dificuldade na penetração do corante (NUNES et al., 2012).

Como observado, todos os biótipos de azevém apresentaram alta estimativa de viabilidade polínica, porém esta pode ser perdida em função do tempo após a abertura da flor. Quando houver a sincronização da floração dos biótipos resistentes e suscetíveis, há a possibilidade de cruzamento e recombinação gênica.

4. CONCLUSÃO

Todos os corantes apresentaram bom desempenho na determinação da viabilidade polínica frente aos biótipos avaliados, exceto o azul de tripan, que subestimou os resultados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIONDO, E.; BATTISTIN, A. Comparação da eficiência de diferentes corantes na estimativa da viabilidade de grãos de pólen em espécies dos gêneros *Eriosema* (DC.) G. Don e *Rhynchosia* Lour (Leguminosae – Faboideae), nativas na Região Sul do Brasil. **Bioikos**, v.15, p.39-44, 2001.

CARÁMBULA, M. **Pasturas y forrajes**. Potenciales y alternativas para producir forraje. Editorial Agropecuario Hemisferio Sur, Montevideo, Tomo I, 2007. 357p.

GOZLEKCI, S.; KAYNAK, L. Investigations on pollen production and quality in some standard pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. In: MELGAREJO-MORENO P., MARTÍNEZ-NICOLÁS J.J., MARTÍNEZ-TOMÉ J. (eds.).

Production, processing and marketing of pomegranate in the Mediterranean region: advances in research and technology. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, p.71-77, 2000.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. 3.ed. Nova York, 1940. 790p.

KEARNS, C.A.; INOUYE, D.W. **Techniques for pollination biologists**. Niwot: University Press of Colorado, 1993. 583p

NUNES, R.C.; BUSTAMANTE, F.O.; TECHIO, V.H.; MITTELMANN, A. Morphology and pollen viability of *Lolium multiflorum* Lam. **Ciência e Agrotecnologia**, v.36, p.180-188, 2012.

ROMAN, E.S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M.A.; MATTEI, R.W. Resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v.22, p.301-306, 2004.

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; MARTINS, E.R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera, e viabilidade polínica em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener). **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, p.1209-1217, 2002.

VARGAS, L.; MORAES, R.M.A.; BERTO, C.M. Herança da resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao glyphosate. **Planta Daninha**, v.25, p.567-571, 2007.

WANG, Z.; GE, Y.; SCOTT, M.; SPANGENBERG, G. Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) (Poaceae) plants. **American Journal of Botany**, v.91, p.523-530, 2004.