

ANATOMIA FOLIAR DE *Lolium multiflorum* SENSÍVEL E RESISTENTE AO GLYPHOSATE¹

Leaf Anatomy of Lolium multiflorum Sensitive and Resistant to Glyphosate

GALVAN, J.², RIZZARDI, M.A.³ CARNEIRO, C.M.⁴ e BIANCHI, M.A.⁵

RESUMO - Este trabalho foi desenvolvido com o intuito de contribuir para o conhecimento anatômico da espécie *Lolium multiflorum* e, a partir disso, observar possíveis alterações que possam elucidar o mecanismo que confere resistência ao herbicida glyphosate. Para isso, realizou-se um experimento com quatro biótipos dessa espécie com distinta sensibilidade ao herbicida glyphosate, sendo um sensível (B1S) e três resistentes (B2R, B3R e B4R). As análises ocorreram a partir de secções transversais e longitudinais dos órgãos vegetativos de plantas no estágio de afilhamento. Anatomicamente, o azevém caracteriza-se por apresentar grande quantidade de estômatos e de células buliformes, bem como mesófilo homogêneo constituído apenas de células paliçádicas compactamente distribuídas. 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 em relação aos demais. Ainda, os biótipos resistentes apresentaram maior quantidade de espaços intercelulares no mesófilo e feixes vasculares com menor quantidade de floema em relação ao xilema, o que, por suas funções na planta, pode colaborar para a menor sensibilidade ao herbicida.

Palavras-chave: estômatos, impressões foliares, floema, secções anatômicas.

ABSTRACT - This work aimed to contribute to the anatomical knowledge of the species *Lolium multiflorum* and to observe possible changes that may elucidate the mechanism that confers its resistance to the herbicide glyphosate. Thus, an experiment was conducted using four biotypes of this species with distinct sensitivities to the herbicide glyphosate: one susceptible (B1S) and three resistant biotypes (B2R, B3R and B4R). Analyses were conducted on the transverse and longitudinal sections of the vegetative organs of the plants at the tillering stage. Anatomically, ryegrass is characterized as having a large number of stomata and buliform cells as well as homogeneous mesophylls constituted only of palisade cells compactly distributed. Comparatively, no evident morphological differences occur that can be used to distinguish sensitive from resistant biotypes; however, the resistant biotypes, especially B3R B4R, presented higher stomatal density, compared to the others. Still, the resistant biotypes had a higher amount of intercellular spaces in the mesophyll and vascular bundles with a smaller amount of phloem compared to the xylem, which, because of their functions in the plants, may contribute to the lower sensitivity to the herbicide.

Keywords: stomata, leaf prints, phloem, anatomic sections.

INTRODUÇÃO

O azevém (*Lolium multiflorum*) é uma poácea anual hibernal amplamente encontrada no Rio Grande do Sul, sendo principalmente

utilizada como forrageira para alimentação do rebanho no inverno e como fornecedora de palhada na cobertura do solo em pomares e em lavouras no sistema de semeadura direta (Vargas et al., 2005).

¹ Recebido para publicação em 13.3.2011 e aprovado em 3.10.2011.

² Eng^a-Agr^a, Aluno do Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo (PPGagro-UPF); ³ Eng^a-Agr^a, Dr., Professor PPGagro-UPF. Bolsista CNPq, Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, UPF, Caixa Postal 611. 99052900. Passo Fundo-RS, <rizzardi@upf.br>; ⁴ Bióloga, Dra., Professora do Instituto de Ciências Biológicas da UPF, ⁵ Eng^a-Agr^a, Dr., Pesquisador da CCGl e Professor da Universidade de Cruz Alta.



Apesar de causar prejuízos quando presente em lavouras de cereais de inverno, o azevém, por possuir crescimento inicial lento, apresenta habilidade competitiva inferior à das culturas. Os prejuízos em produtividade pela convivência entre plantas daninhas e a cultura deve-se especialmente ao fato de que, de acordo com Bianchi et al. (2006), nas áreas agrícolas as plantas daninhas geralmente ocorrem em densidades bem superiores às das espécies cultivadas.

A dessecação das plantas daninhas tem grande importância para o estabelecimento de uma lavoura, visto que a emergência destas, juntamente com a cultura, provoca danos tanto na produtividade como na qualidade dos grãos (Vargas et al., 2005).

O manejo do azevém vem sendo feito há muitos anos, quase que exclusivamente com a utilização de produtos químicos, sobretudo com o herbicida glyphosate.

O uso repetido de glyphosate 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 tiveram dificuldade para controlar o azevém com esse herbicida (Vargas et al., 2005). O uso indiscriminado de herbicidas propiciou o desenvolvimento de muitos casos de resistência a esses compostos por diversas espécies daninhas (Burnside, 1992), incluindo, para o Estado do Rio Grande do Sul, o azevém (Rizzardi et al., 2004).

A eficácia do glyphosate 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); assim, qualquer impedimento pode resultar em grandes prejuízos na eficiência de controle da espécie-alvo.

O glyphosate movimenta-se 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). O estágio de desenvolvimento da planta também altera a eficácia do herbicida, uma vez que ela tem diferentes prioridades para a condução dos seus fotoassimilados via floema.

Ribeiro (2008) observou que não há diferenças na quantidade de ceras epicuticulares por unidade de área entre biótipos sensíveis e resistentes de azevém. Guimarães et al. (2009) também trabalhando com azevém, constataram que ocorrem pequenas diferenças na constituição química das ceras entre os biótipos, sendo que nos resistentes são mais polares. Dessa forma, pelo fato de o glyphosate ser um herbicida essencialmente polar, ele seria favorecido para entrar na planta.

Ferreira et al. (2006) constataram que não há diferença significativa entre plantas de azevém de biótipos resistentes e sensíveis quanto à absorção de glyphosate. Segundo esses autores, o que tem ocorrido é maior retenção do herbicida nas folhas em biótipos resistentes, ao passo que, nos biótipos sensíveis, grande parte do herbicida aplicado na parte aérea é translocada para as raízes.

Considerando os aspectos mencionados, realizou-se a descrição anatômica da folha da espécie com o objetivo de identificar características diferenciais entre biótipos sensíveis e resistentes à ação do herbicida glyphosate, a fim de verificar uma possível alteração morfológica com efeito na translocação e no armazenamento e, conseqüentemente, na sensibilidade ao herbicida.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado neste 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. As análises anatômicas foram realizadas no Laboratório Multidisciplinar Vegetal, no período de setembro a dezembro de 2008, na Universidade de Passo Fundo.

As sementes de azevém utilizadas no experimento passaram por um teste preliminar com a aplicação de 1.920 g e.a. ha⁻¹, de modo que comprovasse a sua sensibilidade ou resistência ao herbicida glyphosate, tendo sido classificadas como: B1S = biótipo sensível e B2R, B3R e B4R = biótipos resistentes.

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

Foram utilizadas folhas completamente expandidas, e as secções, realizadas no terço médio da folha. As secções histológicas foram feitas manualmente, com lâminas de barbear.

As secções selecionadas foram clarificadas em hipoclorito de sódio na concentração de 20%, para que o material perdesse toda a sua coloração natural. Posteriormente, o material foi lavado em água acidulada e destilada. A coloração das secções foi feita com os corantes fucsina básica e azul de 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 análise da superfície epidérmica, selecionaram-se folhas antes de serem fixadas, a fim de realizar impressões foliares. Aplicou-se uma fina camada de esmalte de unha incolor; após secar, ele foi retirado da folha, com auxílio de fita adesiva transparente, e então afixado em lâminas histológicas.

As análises histológicas foram realizadas utilizando-se microscópio óptico (Olympus®, modelo CX31), e a documentação fotográfica foi feita com câmera digital (Sony®, modelo DSC-W50). As fotos foram analisadas, sem edição digital, e descritas de acordo com a nomenclatura histológica atual.

Quanto à determinação do índice estomático e densidade estomática, foram realizadas 30 observações por planta, em campos de área

correspondente a 0,25 mm². A obtenção da densidade estomática nada mais é do que a quantidade de estômatos por mm². O cálculo do índice estomático foi feito pela fórmula: $IE = NE / (CE + NE) * 100$, em que IE é o índice estomático, NE é o número de estômatos e CE é o número de células epidérmicas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, com comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As folhas de azevém evidenciaram padrão anfiestomático, ou seja, presença de estômatos tanto na face adaxial como na abaxial da folha (Figura 1). Os estômatos apresentam a forma de halteres (Figura 2), organizados em fileiras que se intercalam com fileiras sem estômatos, onde eventualmente encontram-se tricomas (Figura 3). Segundo Cutter (1987), a disposição sequencial dos estômatos em fileiras longitudinais é uma característica das poáceas, devido à atividade do meristema intercalar basal.

Os estômatos, cuja função é realizar as trocas gasosas da planta (Apezato-da-Glória & Carmelo-Guerreiro, 2004), têm sua presença e distribuição muito variáveis 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 (Esau, 1993). Essas variações ocorrem tanto entre plantas como na própria planta.

O índice e a densidade estomática mostraram-se bastante variáveis entre os biótipos, porém, segundo Esau (1993), esse critério não é adequado para distingui-los. De acordo com a Tabela 1, a única diferença significativa encontrada entre os biótipos foi o menor índice estomático na planta sensível, na comparação com as resistentes.

Ainda, embora a densidade estomática seja diretamente influenciada pela idade e pelo habitat da planta, esse fator é de suma importância para o vegetal, uma vez que, de acordo com Lima Jr. et al. (2006), o aumento na densidade estomática pode permitir que a planta eleve a condutância de gases e, assim, evitar que a fotossíntese seja limitada sob diferentes condições do ambiente.



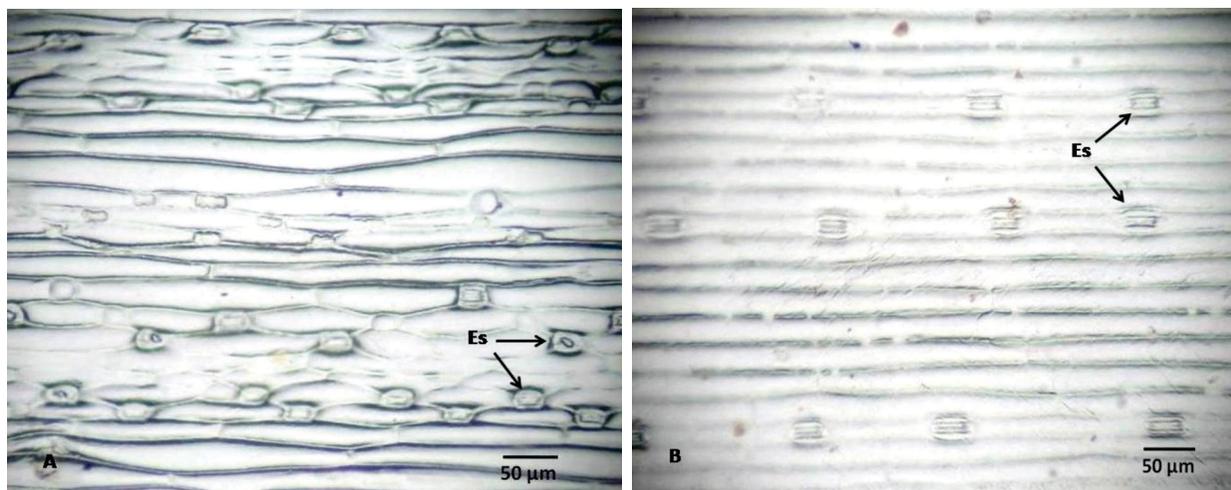


Figura 1 - Impressões foliares, destacando em vista frontal a epiderme e os estômatos (Es) de folhas de azevém (*Lolium multiflorum*). (A) face adaxial; (B) face abaxial.

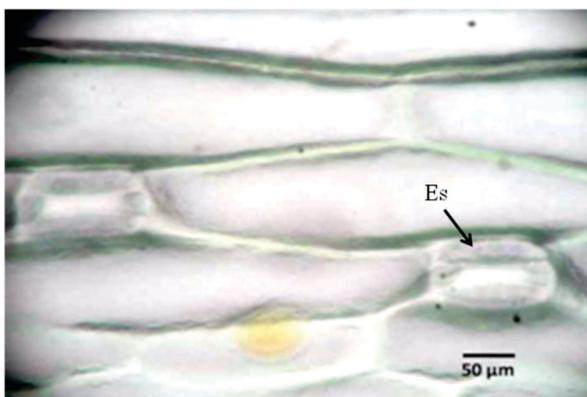
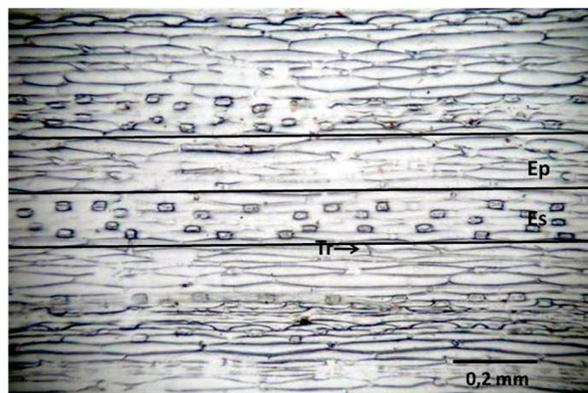


Figura 2 - Impressão foliar, destacando em vista frontal o estômato (Es) em forma de halteres de folhas de azevém (*Lolium multiflorum*).



Es = estômatos; Ep = células epidérmicas; Tr = tricomas. Linhas evidenciam organização em fileiras dos estômatos.

Figura 3 - Vista frontal da epiderme da folha de azevém (*Lolium multiflorum*), evidenciando a disposição dos estômatos.

Tabela 1 - Índice e densidade estomática na epiderme adaxial e abaxial de folhas dos biótipos testados de *Lolium multiflorum*

Biótipo	Índice estomático (%)		Densidade estomática (estômato mm ⁻²)	
	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial
B1S	32,0 ab	44,3 c	39,6 b	88,0 b
B2R	33,6 a	48,4 bc	49,2 a	84,0 b
B3R	30,6 ab	55,7 a	36,8 b	114,8 a
B4R	29,0 b	49,8 b	44,0 ab	108,8 a

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ferreira et al. (2002) afirmam que a cutícula é a principal via de absorção de herbicidas pela planta, mas o uso de surfatantes silicados tem contribuído para quebrar a tensão

superficial da calda, ocasionando assim maior espalhamento do produto e permitindo que os estômatos passem a ter também importante papel na penetração dos herbicidas.

Hess & Falk (1990) afirmaram que outro fator ligado à penetração dos herbicidas pelos estômatos é o fato de que a cutícula sobre as células-guarda parece ser mais fina e mais permeável do que a cutícula sobre outras células epidérmicas.

Notou-se neste trabalho que, em razão de as plantas terem se desenvolvido em ambiente protegido, ocorre maior quantidade de estômatos por unidade de área na face adaxial comparada com a face abaxial, o que não se repete em condições de exposição direta ao sol, uma vez que, para evitar a perda de água, os estômatos localizam-se em maior quantidade na face abaxial, e ainda por vezes protegidos pelo enrolamento das folhas através da ação das células buliformes.

Assumindo que ocorra absorção de herbicidas nos estômatos, como mencionado por Ferreira et al. (2002), neste trabalho esse aspecto não pode ser considerado como o diferencial para a sensibilidade ou resistência ao glyphosate, visto que, entre os biótipos estudados, nem o índice nem a densidade estomática corroboram esse fato (Tabela 1).

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 (Apezzato-da-Glória & Carmelo-Guerreiro, 2004); é um tecido com ampla possibilidade de variação na sua forma, em função do ambiente em que se encontra. Em secção transversal, as células apresentam-se com paredes periclinais biconvexas, proporcionando maior capacidade de aproveitamento da luz incidente na lâmina foliar (Figura 4).

A face adaxial apresenta sulcos ao longo de sua extensão, onde se localizam as células buliformes; ao lado delas, ocorrem os estômatos (Figura 4). Raven et al. (2001) classificam 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 quatro a seis células (Figura 4). A parte elevada desses sulcos apresenta feixes de fibras, os

quais pertencem à extensão da bainha de feixe. Junto a esses feixes de fibras observam-se tricomas tectores, em forma de agulha, embora isso não seja uma regra para todos os feixes e se verifique com modesta ocorrência.

Os tricomas podem atuar como redutor da quantidade de herbicida que alcança a epiderme propriamente dita, por reter algumas gotículas. No entanto, a eficiência da absorção de herbicidas pelos tricomas e a translocação destes para as células epidérmicas ainda são parcialmente desconhecidas.

O mesofilo homogêneo é constituído apenas de células paliçádicas compactamente distribuídas.

O mesofilo da folha de azevém apresentou-se homogêneo, constituído de células paliçádicas compactamente distribuídas (Figura 4). Os feixes vasculares encontram-se envoltos por uma camada de células diferenciadas, caracterizando a bainha do feixe, as quais apresentam disposição característica para cada biótipo estudado; contudo, visivelmente, o biótipo sensível destaca-se pelo reduzido tamanho de suas células da bainha, em comparação com os demais biótipos.

Verifica-se que, na comparação entre as secções anatômicas, o biótipo sensível (Figura 4A) apresentou maior compactação das células do mesofilo, reduzindo conseqüentemente a quantidade de espaços intercelulares, em relação aos resistentes (Figura 4B, C e D); em consequência dessa compactação, menor quantidade de CO₂ circulante fica disponível para ser utilizada na fotossíntese. Ressalta-se ainda que a existência de gases no mesofilo exerce maior pressão no interior da lâmina foliar, dificultando a passagem da água – nesse caso, o glyphosate – de uma célula para outra, visto que a literatura cita a translocação do glyphosate tanto pela via apoplasto como pela simplasto. O glyphosate, após atravessar a epiderme, deve chegar aos feixes vasculares, que irão carregar o herbicida para as diferentes partes da planta.

Os biótipos sensíveis diferem ainda pela maior proporção de floema em relação ao xilema no biótipo sensível comparado aos resistentes (Figuras 5 e 6). Como já mencionado, o herbicida glyphosate se movimenta na planta seguindo a rota dos fotoassimilados pelo



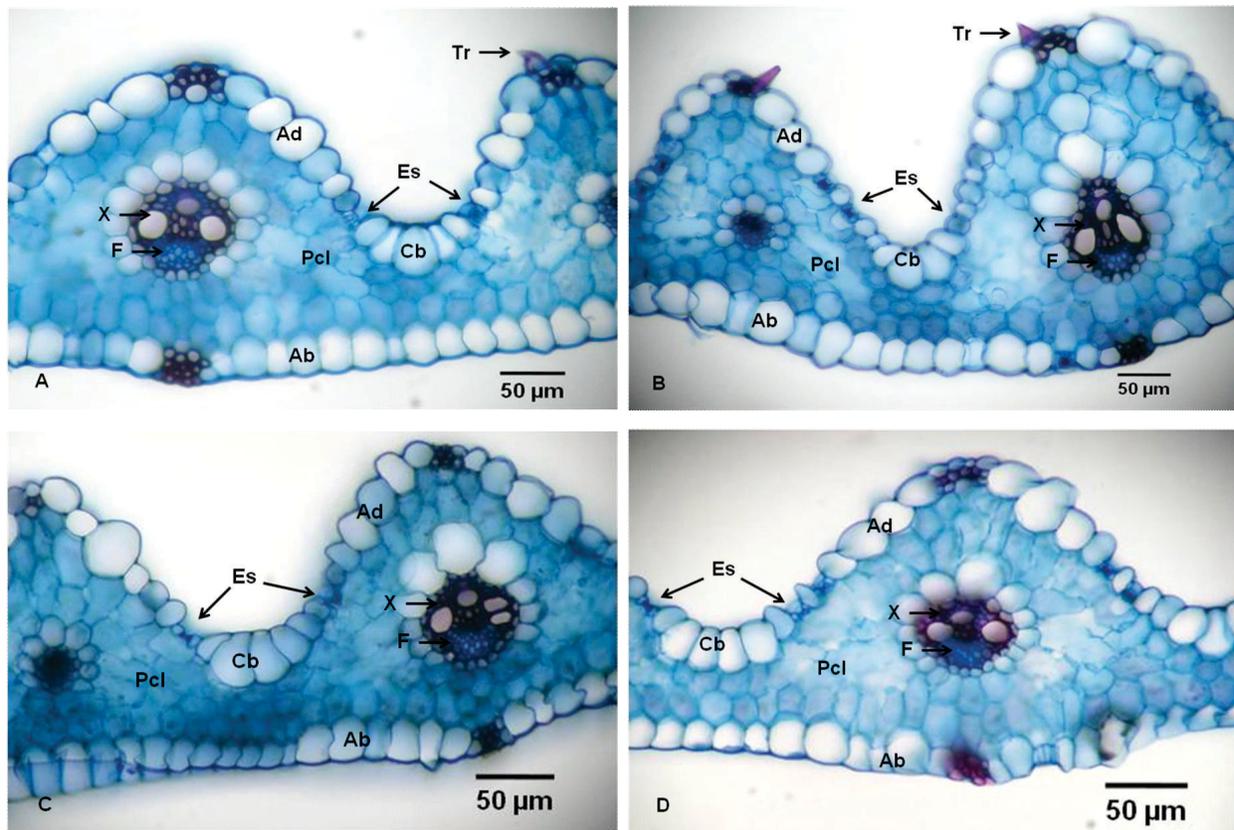


Figura 4 - Secção transversal da folha de *L. multiflorum*. (A) B1S; (B) B2R; (C) B3R; (D) B4R. Ab = epiderme abaxial; Ad = epiderme adaxial; Cb = células buliformes; Es = estômatos; Pcl = parênquima clorofiliano; Tr = tricoma; X = xilema; F = floema.

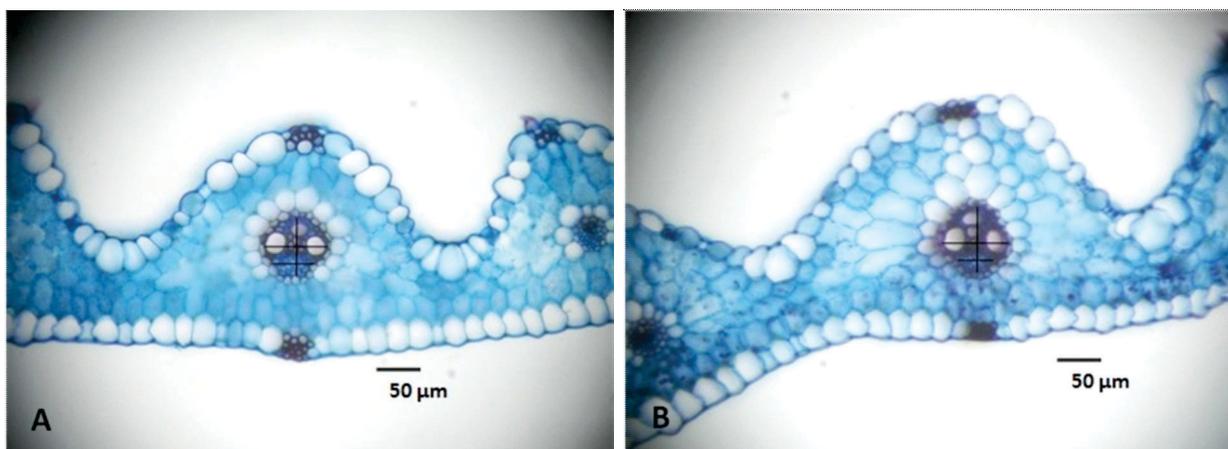


Figura 5 - Secção transversal da folha de *L. multiflorum*. Detalhe da relação xilema/floema das folhas entre os biótipos: (A) sensível; (B) resistente.

floema, o que permite inferir que, quanto maior a proporção de floema, maior a translocação do herbicida da folha para as demais partes da planta.

Assim, de acordo com as observações anatômicas realizadas, a maior quantidade de espaços intercelulares no mesofilo, bem como a menor quantidade de floema em relação ao

xilema no biótipo resistente, comparativamente ao biótipo sensível, pode, pelas funções desempenhadas na planta, colaborar para a menor sensibilidade deles ao herbicida glyphosate.

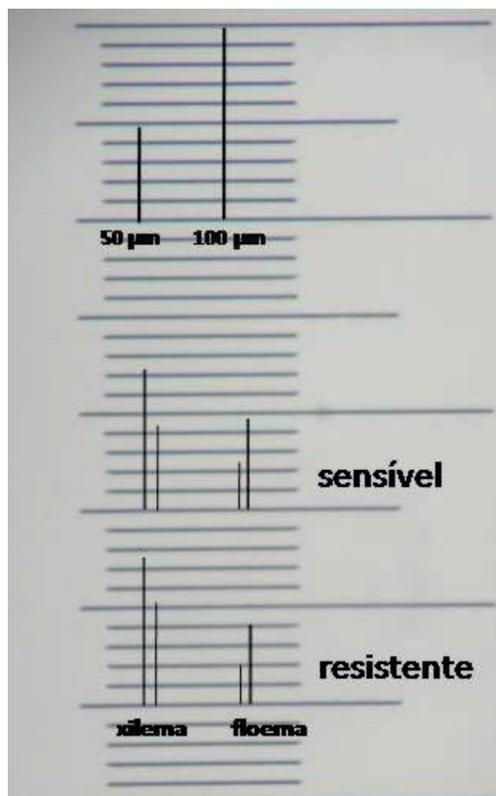


Figura 6 - Escala micrométrica, com detalhamento da relação xilema/floema entre folhas de diferentes biótipos.

LITERATURA CITADA

- APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2003. 438 p.
- BIANCHI, M. A.; FLECK, N. G.; LAMEGO, F. P. Proporção entre plantas de soja e plantas competidoras e as relações de interferência mútua. **Ci. Rural**, v. 36, n. 3, p. 1380-1387, 2006.
- BURNSIDE, O. C. Rationale for developing herbicide-resistant crops. **Weed Technol.**, v. 6, n. 3, p. 621-625, 1992.
- CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal**. Parte II. Órgãos. 2.ed. São Paulo: Roca, 1987. 336 p.
- ESAU, K. **Anatomia das plantas com semente**. São Paulo: Edgard Blücher, 1993. 293 p.
- FERREIRA, E. A. et al. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas. II - *Bidens pilosa*, *Emilia sonchifolia*, *Ageratum conyzoides* e *Sonchus asper*. **Planta Daninha**, v. 20, n. 3, p. 327-335, 2002.
- FERREIRA, E. A. et al. Translocação do glyphosate em biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*). **Planta Daninha**, v. 24, n. 2, p. 365-370, 2006.
- GUIMARÃES, A. A. et al. Caracterização química da cera epicuticular de biótipos de azevém resistente e suscetível ao glyphosate. **Planta Daninha**, v. 27, n. 1, p. 149-154, 2009.
- HESS, F. D.; FALK, R. H. Herbicide deposition on leaf surfaces. **Weed Sci.**, v. 38, n. 3, p. 280-288, 1990.
- HETHERINGTON, P. et al. The absorption, translocation and distribution of the herbicide glyphosate in maize expressing the CP-4 transgene. **J. Exper. Bot.**, v. 50, n. 339, p. 1567-1576, 1998.
- LIMA Jr., E. C. et al. Aspectos fisioanatômicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* Camb. submetidas a diferentes níveis de sombreamento. **R. Árvore**, v. 30, n. 1, p. 33-41, 2006.
- KIRKWOOD, R. C.; MCKAY, I. Accumulation and elimination of herbicides in select crop and weed species. **Pestic. Sci.**, 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. 906 p.
- RIBEIRO, D. **Caracterização da resistência ao herbicida glyphosate em biótipos da planta daninha *Lolium multiflorum* (Lam.)**. 2008. 102 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.
- RIZZARDI, M. et al. Glyphosate herbicide resistance in ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam). In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7., INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4., E BRAZILIAN SOYBEAN CONGRESS, 3., 2004, Foz do Iguaçu. **Abstracts of contributed papers and posters**. Londrina: Embrapa, 2004. v. 228. p. 94.
- SATICHIWI, N. M. et al. Absorption and translocation of glyphosate isopropylamine and trimethylsulfonium salts in *Abutilon theophrasti* and *Setaria faberi*. **Weed Sci.**, v. 48, n. 6, p. 675-679, 2000.
- VARGAS, L. et al. Alteração das características biológicas de azevém (*Lolium multiflorum*) ocasionada pela resistência ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 153-160, 2005.
- WANAMARTA, G. D.; PENNER, D. Foliar absorption of herbicides. **Rev. Weed Sci.**, v. 4, n. 3, p. 215-231, 1989.

