

IDENTIFICAÇÃO DA TAXA DE FECUNDAÇÃO CRUZADA E PROLIFICIDADE DE *Echinochloa crus-galli*.

PISONI, A.¹; RAFAELI, R. S.²; COSTA, E.²; MENEZES, C.²; DALAZEN, G.³, KASPARY, T.³, LAUX, D.²; MEROTTO, A.⁴

Palavras-chave: Capim-arroz, fluxo gênico, produção de sementes

INTRODUÇÃO

O capim-arroz (*Echinochloa spp.*) é uma das plantas daninhas mais problemáticas de lavouras de arroz irrigado do sul do Brasil. Esta planta possui resistência aos herbicidas imidazolinonas através do incremento de metabolização e devido a ocorrência de alteração do local de ação causada pelas mutações Ser653 e Trp574 no gene ALS, além de populações contendo os dois mecanismos de resistência (Matzenbacher *et al.*, 2014).

Em plantas cuja reprodução é predominantemente sexuada a dispersão de grãos de pólen durante a fase reprodutiva possui grande relevância na evolução da resistência aos herbicidas. Este sistema de fecundação está associado, ao fluxo gênico e possibilita a dispersão do alelo de resistência para plantas suscetíveis (Latta *et al.*, 1998). A quantificação do fluxo gênico pode permitir a estimativa do epicentro da resistência a herbicidas, a comparação relativa da origem da resistência relacionada a fluxo gênico ou evolução independente e previsões da distribuição de futuras características de resistência (Smith *et al.*, 2015)

A informação sobre a taxa de fecundação cruzada em capim-arroz nas condições do sul do Brasil não é existente. Esta informação é importante, pois a quantificação do fluxo gênico pode permitir uma estimativa sobre a facilidade de dispersão da resistência quando originada por mutação no local de ação e sobre a possibilidade de empilhamento de genes menores relacionados ao incremento da metabolização do herbicida (Smith *et al.*, 2015).

Assim como para a dispersão da resistência pelo fluxo de pólen, a produção e dispersão de sementes constitui um dos principais mecanismos para o aumento da frequência inicial de indivíduos resistentes em áreas agrícolas. Um conhecimento profundo da biologia do capim-arroz é fundamental para a concepção de programas eficazes de gestão de resistência. A produção de sementes é uma importante característica para determinação da dinâmica populacional de plantas daninhas em longo prazo (Davis *et al.*, 2003), sendo este um caráter de alta plasticidade e dependente das condições e locais de cultivo, disponibilidade de nutrientes, fotoperíodo e densidade de plantas. Valores de produção de sementes podem variar de 2.000 a 40.000 por planta (Holm *et al.*, 1977).

Os objetivos deste trabalho foram identificar a taxa de fecundação cruzada e a ocorrência de hibridização em capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*), além de estimar a produção de sementes das mesmas.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado a campo na Estação Experimental da Empresa Oryza & Soy localizada em Palmares do Sul, RS. A resistência aos herbicidas do grupo químico imidazolinonas foi utilizada como marcador para a quantificação do fluxo gênico em *E. crus-galli*. As plantas doadoras de pólen corresponderam a um biótipo com resistência a estes herbicidas relacionada a ocorrência da mutação Trp574 no gene ALS. As plantas receptoras de pólen corresponderam a um biótipo suscetível aos herbicidas imidazolinonas. As plantas homozigotas resistentes e suscetíveis foram germinadas e cultivadas em casa de vegetação até o estágio de cinco a seis folhas, quando foram então transplantadas para o campo. O experimento constituiu-se por quatro áreas, sendo que em cada uma foram transplantadas 20 plantas resistentes (doadoras de pólen) e 12 plantas suscetíveis (receptoras de pólen) a

1 Eng. Agrônomo, UFRGS, Rua Santos Dumont, Centro, 175, Tuparendi, ale_pisoni@yahoo.com.br

2 Bolsista de iniciação científica FAURGS, UFRGS

3 Me. Agronomia, UFRGS.

4 Dr Ecology Weed Science, UFRGS

uma distância de 1m entre plantas. Cada área experimental foi constituída por 12 repetições, sendo estas as 12 plantas receptoras utilizadas na coleta de sementes e posterior avaliação de sobrevivência e vigor.

As sementes foram colhidas individualmente por planta a cada cinco dias. A fim de determinar o número de sementes a serem avaliadas no ensaio de fecundação cruzada, foram considerados os seguintes parâmetros para a determinação do tamanho da amostra: frequência de fluxo gênico de 0,01, poder de 0,85 e 5% de nível de confiança que resulta na necessidade de avaliação de 2.242 sementes (Jhala *et al.*, 2011).

A identificação da ocorrência de fecundação cruzada foi realizada após a semeadura e crescimento das plântulas em casa de vegetação. Quando as plantas atingiram de 3-4 folhas aplicou-se o herbicida imazetapir na dose de $106 \text{ g. ha}^{-1} + 0,5\% \text{ v/v}$ de Dash. A aplicação foi realizada em câmara de aplicação pressurizada com CO_2 , com vazão de 200 L/ha. As avaliações foram realizadas ao final de 21 dias após a aplicação (DAA), onde as plantas sobreviventes foram consideradas resistentes aos herbicidas imidazolinonas e portadoras de alelos heterozigotos do gene ALS advindos do parental doador. Além disto, as plantas sobreviventes foram quantificadas em classes através de avaliações visuais de acordo com suas características de vigor ao final de 21 DAA, onde, plantas pertencentes a escala 1 constituem plantas normais, escala 2 são plantas normais de crescimento reduzido e escala 3 são plantas anormais de crescimento reduzido.

A porcentagem de fecundação cruzada foi calculada dividindo o número de plântulas que sobreviveram à aplicação do herbicida pelo total de plântulas avaliadas para cada área.

O número total de sementes coletados por planta ao final do experimento foi utilizado para estimativa da quantidade total de sementes produzidas por planta de capim-arroz da espécie *E. crus-galli*. Esta estimativa foi realizada por meio da pesagem de quatro repetições de 200 sementes para cada planta da qual foi coletada sementes (10 repetições). Os dados foram submetidos a análise de normalidade e a análise de variância foi realizada pelos pressupostos da ANOVA através de teste Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em um total de 10.000 plantas avaliadas nas quatro áreas em que o experimento foi conduzido foram encontradas 346 plantas resistentes, o que resultou em uma taxa de fluxo gênico média de 3,46% (Tabela 1). A taxa de fecundação cruzada intraespecífica variou significativamente entre as quatro áreas avaliadas, apresentando desde 2,96% (área D) até 4,41% de fecundação cruzada (área C), sendo este o maior valor observado.

TABELA 1. Resultados das contagens de plantas sobreviventes para determinação do nível de fecundação cruzada e produção de sementes de *Echinochloa crus-galli*. Porto Alegre, RS, 2015.

Área	Total de plantas avaliadas	Nº de plantas sobreviventes	Taxa de fecundação cruzada (%)	Nº médio de sementes/planta
A	2.500	78	3,11b	20.251b*
B	2.500	74	3,37ab	20.927ab
C	2.500	128	4,41a	21.060ab
D	2.500	66	2,96b	23.107a
MÉDIA GERAL	10.000	346	3,46	21.336
CV (%)			14.12	10,52

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados semelhantes foram recentemente observados também para *E. crus-galli*, onde detectou-se 3,22% (2010) e 4,47% (2011) de fluxo gênico com as plantas a uma distância de 0,5 m entre si, diminuindo exponencialmente a distâncias maiores (0,01% a 50m) (Bagavathiannan & Norsworthy, 2014). Sabe-se que o fluxo gênico (via pólen) é um processo dependente de vários fatores, como sincronismo floral, elevada compatibilidade, abundância de vetores e métodos de difusão de pólen, distância de movimentação do pólen e condições ambientais apropriadas para polinização cruzada (Carpenter *et al.*, 2002). Estes

fatores podem explicar as variações observadas entre as diferentes áreas conforme descrito acima. Taxas variadas de fecundação cruzada dentro de biótipos da mesma espécie também foram observadas em plantas de arroz, oscilando de 0,01 a 52% dependendo das condições ambientais e de cultivo, das características inerentes aos biótipos, da época de florescimento e da distância entre plantas (Langevin *et al.*, 1990; Shivrain *et al.*, 2009).

A produção de sementes também representa uma relevante estratégia do capim arroz para perpetuação da espécie e simultaneamente com o fluxo de pólen constitui uma das mais importantes estratégias de dispersão da resistência a herbicidas. A produção de sementes por planta variou de 20.251 até 23.107 sementes (Tabela 1). A produção de sementes da espécie *E. crus-galli* é variável dependendo principalmente das condições de cultivo, densidade das plantas, e condições do meio, sendo que em estudo realizado a campo no Sul dos Estados Unidos foi encontrada produção de 2.900 a 39.000 sementes por planta (Bagavathiannan *et al.*, 2011). No entanto, quando em condições ideais de crescimento obteve-se produções de até 1 milhão de sementes por planta (Mitich, 1990),.

Enfatizando-se a importância da taxa de fecundação cruzada e da produção de sementes de capim-arroz no aumento da frequência de indivíduos resistentes em áreas agrícolas, pode-se estimar de maneira simples o número de plantas daninhas resistentes na área a partir dos resultados obtidos no presente estudo. Uma área agrícola com a presença de apenas uma planta de capim arroz contendo resistência a herbicidas devido a presença de um gene nuclear dominante, já no primeiro ano de desenvolvimento poderia produzir mais de 23 mil plantas resistentes oriundas de suas sementes. Além disso, caso ocorra fluxo gênico para 50 plantas suscetíveis, presentes no entorno da mesma, através da taxa de fecundação cruzada de 3,46 e uma quantidade de sementes produzidas por planta de até 23.000, poder-se-ia observar o surgimento de 39.790 plantas contendo o gene de resistência oriundo de fluxo gênico.

Foram observadas variações morfológicas resultantes da aplicação do agente selecionador dentre as 346 plantas sobreviventes (Tabela 2). Em relação às diferenças de vigor observadas nas plantas sobreviventes, foram encontradas desde plantas apresentando desenvolvimento normal, sendo classificadas como pertencendo a classe, até plantas de tamanho reduzido e apresentando desenvolvimento estrutural anormal (Classe 3).

TABELA 2. Número de plantas sobreviventes a aplicação de imazetapir em função das classes de vigor. Porto Alegre, RS, 2015.

Classificação	Número de plantas
CLASSE 1	84 b*
CLASSE 2	107 ab
CLASSE 3	155 a
CV (%)	21.36

*Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

As variações observadas nos fenótipos das plantas sobreviventes podem ser decorrentes de inúmeros fatores, como variabilidade genética relacionada a genes de detoxificação, absorção e translocação e variação da atividade da enzima ALS, ou ainda fatores relacionados a variação ambiental como diferente quantidade interceptada do herbicida entre as plantas.

No caso da resistência mediada pelo citocromo P450, a resistência é de origem poligênica, sendo que avaliações através de uma única dose do herbicida tornam-se mais complexa porque os indivíduos desta população são geneticamente variáveis, podendo, após o fluxo gênico, observar-se a presença de genes de resistência "empilhados". Em situações, onde a variação fenotípica é sustentada por variação genética aditiva, a recombinação dessa variação através de fluxo gênico, por exemplo, pode levar a um rápido e variável aumento na resistência (Preston, 2003). Possivelmente este estado de

heterozigose ligada aos genes relacionados com a metabolização do herbicida pode ter proporcionado variações no GR50 das plantas sobreviventes, apresentando diferentes graus de sensibilidade a uma mesma dose de herbicida aplicado.

Mesmo com as frequências de fluxo gênico observadas sendo relativamente baixas, pode haver consequências evolutivas significativas em populações não selecionadas, pois os níveis de fluxo gênico detectados no presente estudo são tipicamente maiores do que a frequência inicial esperada de um determinado alelo de resistência a herbicida em uma população de plantas daninhas antes da seleção (1×10^{-6}), resultando em um aumento exponencial do número de plantas resistentes dentro de uma população.

CONCLUSÃO

A taxa de fluxo gênico média na espécie de capim arroz *E. crus-galli*, nas condições do presente estudo é de 3,46%.

A produção de sementes de *E. crus-galli* pode chegar a 23.107 sementes por planta, quando cultivadas em condições de campo a uma densidade de 1 planta/m². Estes fatores caracterizam a importância do fluxo gênico para a dispersão da resistência a herbicidas em capim-arroz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAGAVATHIANNAN, M. V., *et al.* Seed production of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in response to time of emergence in cotton and rice. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 150, n. 6, p. 717-724, 2011.
- BAGAVATHIANNAN, M. V.; NORSWORTHY, J. K. Pollen-mediated transfer of herbicide resistance in *Echinochloa crus-galli*. **Pest Management Science**, USA, v. 70, n. 9, p. 1425-1431, September 2014.
- BUSI, R., *et al.* Genetic control of a cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance mechanism in *Lolium rigidum*. **Heredity**, New York, v. 106, n. 5, p. 817-824, 2011.
- CARPENTER, J., *et al.* **Comparative Environmental Impacts of Biotechnology-derived and traditional soybeans, corn, and cotton crops**. Council for Agricultural Science and Technology. Ames: Iowa, 2002.
- DAVIS, A., *et al.* Cropping system effects on giant foxtail (*Setaria faberii*) demography: II. Retrospective perturbation analysis. **Weed Science**, Lawrence, v. 51, n. 1, p. 930-939, 2003.
- HOLM, L. G., *et al.* Ed. 1. **The World's Worst Weeds: Distribution and Biology**. Honolulu, USA: University Press of Hawaii, 1977.
- JHALA, A. J., *et al.* Pollen-mediated gene flow in flax (*Linum usitatissimum* L.): can genetically engineered and organic flax coexist? **Heredity**, New York, v. 106, n. 1, p. 557-566, 2011.
- LANGVIN, S. A., *et al.* The incidence and effects of hybridization between cultivated rice and its related weed red rice (*Oryza sativa* L.). **Evolution**, USA, v. 44, n. 4, p. 1000-1008, 1990.
- LATTA, R. G., *et al.* Direct and indirect estimates of seed versus pollen movement within a population of Ponderosa pine. **Evolution**, USA, v. 52, n. 1, p. 61-67, 1998.
- MATZENBACHER, F. O. *et al.* Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone and quinclorac herbicides. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, In Press, July 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0021859614000768>.
- MITICH, L. W. Intriguing world of weeds: barnyardgrass. **Weed Technology**, USA, v. 4, n. 1, p. 918-920, 1990.
- PRESTON, C. Inheritance and Linkage of Metabolism-Based Herbicide Cross-Resistance in Rigid Ryegrass (*Lolium rigidum*). **Weed Science**, Lawrence, v. 51, n. 1, p. 4-12, 2003.
- SHIVRAIN, V. K. *et al.* Factors affecting the outcrossing rate between Clearfield (TM) rice and red rice (*Oryza sativa*). **Weed Science**, Lawrence, v. 57, n. 4, p. 394-403, 2009.
- SMITH, C., *et al.* Experimental Methods to Study Gene Flow. **Weed Science**, Lawrence, v. 63, n. 1, p. 12-22, 2015.