

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Dissertação

**Resistência múltipla e habilidade competitiva de *Lolium multiflorum* Lam. aos herbicidas glifosato (EPSPs), iodosulfurom-metílico e piroxsulam (ALS)**

**Jonas Rodrigo Henckes**

Pelotas, 2018

**JONAS RODRIGO HENCKES**

**Resistência múltipla e habilidade competitiva de *Lolium multiflorum* Lam. aos herbicidas glifosato (EPSPs), iodosulfurom-metílico e piroxsulam (ALS)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fitossanidade (área do conhecimento: Herbologia).

Orientador: Dr. Leandro Vargas

Coorientador: Dr. Dirceu Agostinetto

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

H111r Henckes, Jonas Rodrigo

Resistência múltipla e habilidade competitiva de *Lolium multiflorum* aos herbicidas glifosato (EPSPs), iodosulfurom- metílico e piroxsulam (ALS) / Jonas Rodrigo Henckes ; Leandro Vargas, orientador ; Dirceu Agostineto, coorientador. — Pelotas, 2018.

91 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Azevém. 2. Resistência cruzada. 3. Valor adaptativo.  
4. Mecanismos de resistência. I. Vargas, Leandro, orient. II.  
Agostineto, Dirceu, coorient. III. Título.

CDD : 633.2

**Banca examinadora:**

---

Eng. Agr. Dr. André Andres

---

Bióloga Dra. Daiane de Pinho Benemann

---

Eng. Agr. Dr. Dirceu Agostinetto

---

Eng. Agr. Dr. Leandro Vargas  
(Orientador)

Aos meus pais, José e Leila;  
Irmão Jardel, avó Belmira;  
E aos demais familiares e amigos.

**OFEREÇO E DEDICO**

***Não se acostume com o que não o faz feliz, revolte-se quando julgar necessário. Alague seu coração de esperanças, mas não deixe que ele se afogue nelas. Se achar que precisa voltar, volte! Se perceber que precisa seguir, siga! Se estiver tudo errado, comece novamente.  
Se estiver tudo certo, continue.***

***Fernando Pessoa***

## **Agradecimentos**

A Deus, pelo dom da vida e pela força, coragem e perseverança para sempre seguir em frente.

Aos meus pais José Henckes e Leila Maria Bamberger, meu irmão Jardel Gustavo Henckes, minha avó Belmira Bamberger e demais familiares pela educação que me deram e a compreensão e apoio nos momentos de dificuldade e por entenderem que as dificuldades e a distancia tornam nossos elos cada vez mais fortes.

A minha namorada, pelo incentivo, paciência e apoio nos momentos de dificuldades, por confiar em mim e ter compreendido todos os momentos em que não pude me fazer presente.

Ao professor Leandro Vargas pela orientação, apoio em todos os momentos, conhecimento compartilhado, disponibilidade, dedicação, confiança, convivência e amizade.

Ao professor Dirceu Agostinetti, por toda a ajuda e coorientação, a todos os seus ensinamentos, conselhos, incentivo, amizade e confiança.

Ao amigo e colega Cristiano Piasecki pela amizade, torcida, pelas longas conversas e conselhos, apoio e incentivo incondicional.

Aos demais colegas e amigos Alcimar Mazon, Andres Monge, Andressa Pitol, Bruno Moncks, Edna Souza, Francisco Goulart, Joanei Cechin, Juliano Gazola, Maicon Schmitz, Queli Ruchel e Renan Zandoná pela amizade, incentivo, auxílio na execução dos trabalhos e pelos momentos de convívio.

Aos estagiários e bolsistas: Kevin Weisshahn, Jonathan Torchelsen, José Vitor Silva, Joao Goebel, Roberto Avila Neto, Thiago Raphaelli pela amizade e auxílio na execução dos experimentos.

A Embrapa Trigo pela disponibilização das suas instalações para a realização dos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade pela oportunidade de realização do mestrado e aos professores que contribuíram para minha formação, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos funcionários da Embrapa Trigo, em especial Egidio Sbrissa e Marina Teixeira, pela amizade e pelo auxílio na condução dos trabalhos do mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Por fim, meus agradecimentos a todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste estudo.

Muito obrigado!



## Resumo

HENCKES, Jonas Rodrigo. **Resistência múltipla e habilidade competitiva de *Lolium multiflorum* aos herbicidas glifosato (EPSPs), iodosulfurom-metílico e piroxsulam (ALS)**, 2018. 91f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Os herbicidas inibidores da EPSPs e ALS são os mais utilizados para o controle de azevém na cultura do trigo e conseqüentemente resultam na seleção dos biótipos resistentes naturalmente presentes no ambiente. A identificação e caracterização desses biótipos é fundamental para o manejo da espécie de planta daninha. Deste modo, os objetivos da pesquisa foram avaliar a ocorrência de resistência múltipla e cruzada em biótipos de azevém aos herbicidas inibidores da ALS e EPSPs; verificar o mecanismo de resistência em plantas suscetíveis e resistentes, através: do acúmulo de ácido chiquímico em resposta a aplicação de glifosato, da atividade da enzima ALS ao iodosulfurom-metílico e da resposta dos biótipos a aplicação de glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam, após tratamento com inibidor de metabolismo da cyt-P450 monooxigenase; e, avaliar o valor adaptativo e a habilidade competitiva dos biótipos de azevém resistente e suscetível ao herbicida glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam. Foram conduzidos experimentos em casa de vegetação e laboratório, utilizando-se sementes provenientes de plantas que sobreviveram ao controle do glifosato e iodosulfurom-metílico suspeitas de resistência, coletadas em lavouras no Estado do Rio Grande do Sul (RS) e Paraná (PR). Os resultados permitem concluir que o biótipo de azevém 110 possui resistência múltipla aos herbicidas glifosato (EPSPs), iodosulfurom-metílico e piroxsulam (ALS) e resistência cruzada aos herbicidas iodosulfurom-metílico e piroxsulam (ALS) dos grupos das sulfonilureias e triazolpirimidinas e, o biótipo Susc é suscetível ao glifosato e inibidores da enzima ALS. O mecanismo de resistência ao glifosato do biótipo 110 não é devido a insensibilidade da EPSPs ao glifosato. A resistência do biótipo 110 é resultado da insensibilidade da enzima ALS ao herbicida iodosulfurom-metílico sódico. O biótipo 110 não apresenta metabolismo do glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam pelo complexo cyt-P450 no que se refere à inibição por malathion ou butóxido de piperonila (PBO). Não há diferença na habilidade competitiva entre os biótipos 110 e Susc.

**Palavras-chave:** azevém; resistência cruzada; valor adaptativo, mecanismos de resistência.

## Abstract

HENCKES, Jonas Rodrigo. **Multiple resistance and competitive ability of *Lolium multiflorum* Lam to glyphosate (EPSPs), iodosulfuron-methyl and piroxsulam (ALS)**, 2018. 91f. Master of Science - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The herbicides inhibiting EPSPs and ALS are the most used for the control of ryegrass in wheat and consequently result in the selection of naturally occurring resistant biotypes in the environment. The identification and characterization of these biotypes is fundamental for the management of the weed species. Thus, the objectives of the research were to evaluate the occurrence of multiple and cross resistance in ryegrass biotypes to ALS inhibitor herbicides and EPSPs; to verify the mechanism of resistance in susceptible and resistant plants through the accumulation of shikimic acid in response to application of glyphosate; of the activity of the enzyme ALS to iodosulfuron-methyl and of the response of the biotypes to the application of glyphosate, iodosulfuron-methyl and piroxsulam after treatment with cyt-P450 monooxygenase metabolism inhibitor; to evaluate the adaptive value and competitive ability of ryegrass biotypes resistant to and susceptible to glyphosate, iodosulfuron-methyl and piroxsulam herbicides. Experiments were conducted in a greenhouse and laboratory, using seeds from plants that survived the control of the suspected resistance of glyphosate and iodosulfuron-methyl, collected in crops in the State of Rio Grande do Sul (RS) and Paraná (Paraná State). The results allow us to conclude that ryegrass biotype 110 has multiple resistance to glyphosate herbicides (EPSPs), iodosulfuron-methyl and pyroxsulam (ALS), and cross-resistance to iodosulfuron-methyl and pyroxsulam (ALS) herbicides of the sulfonylureas and triazolopyrimidines groups, and Susc biotype is susceptible to glyphosate and ALS inhibitors. The mechanism of glyphosate resistance of biotype 110 is not due to the insensitivity of EPSPs to glyphosate. Resistance of the biotype 110 is a result of the insensitivity of the ALS enzyme to the sodium iodosulfuronmethyl methyl herbicide. The biotype 110 does not exhibit glyphosate, iodosulfuron-methyl and pyroxsulam metabolism by the cyt-P450 complex with respect to inhibition by malathion or piperonyl butoxide (PBO). There is no difference in the competitive ability between the 110 and Susc biotypes

**Keywords:** ryegrass; cross resistance; adaptive value, resistance mechanisms.

## Lista de figuras

Figura 1	Controle (%) de biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) suscetível (Susc) e resistente (110), em função da aplicação de glifosato, aos 28 dias após o tratamento (DAT). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	29
Figura 2	Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) de biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) suscetível (Susc) e resistente (110), em resposta a aplicação de diferentes doses do herbicida glifosato avaliada aos 28 DAT. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	30
Figura 3	Controle (%) de biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) suscetível (Susc) e resistente (110), em função da aplicação de iodosulfurometílico, aos 28 dias após o tratamento (DAT). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	32
Figura 4	Controle (%) de biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) suscetível (Susc) e resistente (110), em função da aplicação de piroxsulam, aos 28 dias após o tratamento (DAT). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	33
Figura 5	Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) de biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) suscetível (Susc) e resistente (110), em resposta a aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurometílico avaliada aos 28 DAT. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	34
Figura 6	Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) suscetível (Susc) e resistente (110), em resposta a aplicação de diferentes doses do herbicida piroxsulam avaliada aos 28 DAT. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	34

Figura 7	Acúmulo de ácido chiquímico (mg mL <sup>-1</sup> ) de biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) suscetível (Susc) e resistente (110), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida glifosato, avaliado as 24 horas após o tratamento (HAT). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	44
Figura 8	Acúmulo de ácido chiquímico (mg mL <sup>-1</sup> ) de biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) suscetível (Susc) e resistente (110), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida glifosato, avaliado as 48 horas após o tratamento (HAT). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	45
Figura 9	Acúmulo de ácido chiquímico (mg mL <sup>-1</sup> ) de biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) suscetível (Susc) e resistente (110), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida glifosato, avaliado as 48 horas após o tratamento (HAT). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	46
Figura 10	Curva padrão de acetoína utilizada para a determinação da atividade da enzima ALS em biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ). Embrapa Trigo, Passo Fundo/RS, 2017.....	49
Figura 11	Curva padrão de proteína utilizada para a determinação da atividade da enzima ALS em biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ). Embrapa Trigo, Passo Fundo/RS, 2017.....	49
Figura 12	Atividade da enzima acetolactato sintase (ALS) de biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) resistente (110) e suscetível (Susc) ao herbicida iodosulfurom-metilico sódico expressa em produção de acetoína em função de diferentes concentrações de substrato (piruvato). Embrapa Trigo, Passo Fundo/RS 2017.....	51
Figura 13	Inibição <i>in vitro</i> da atividade da enzima ALS em biótipo de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) resistente (110) e suscetível (Susc) pelo herbicida iodosulfurom-metilico sódico. Embrapa Trigo, Passo Fundo/RS 2017.....	52
Figura 14	Duração em dias dos estágios fenológicos de biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) resistente (110) e suscetível (Susc) com base na escala fenológica adaptada de Bleiholder et al. (1991). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	64
Figura 15	Número de afilhos de biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) suscetível (Susc) e resistente (110), avaliados dos 15 aos 140 DAE. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	65

Figura 16	Estatura de biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) suscetível (Susc) e resistente (110), avaliados dos 15 aos 140 DAE. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017 .....	67
Figura 17	Massa da matéria seca da parte aérea de biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) suscetível (Susc) e resistente (110), avaliados dos 15 aos 140 DAE. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	68
Figura 18	Área foliar de biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) suscetível (Susc) e resistente (110), avaliados dos 15 aos 140 DAE. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	69
Figura 19	Índice de área foliar de biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) suscetível (Susc) e resistente (110), avaliados dos 15 aos 140 DAE. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	70
Figura 20	Razão da área foliar de biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) suscetível (Susc) e resistente (110), avaliados dos 15 aos 140 DAE. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	71
Figura 21	Taxa de crescimento absoluto de biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) suscetível (Susc) e resistente (110), avaliados dos 15 aos 140 DAE. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	72
Figura 22	Produtividade relativa (PR) e total (PRT) para: a) afilhamento; b) estatura; c) área foliar relativa; d) massa da matéria seca de biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) resistente (110) e suscetível (Susc). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	74

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Localização dos biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) submetidos a aplicação de 2160g e.a. ha <sup>-1</sup> de glifosato, 5g i.a. ha <sup>-1</sup> de iodosulfurometílico. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2016.....	24
Tabela 2	Doses dos herbicidas utilizadas para a seleção dos biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) suspeitos de resistência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2016.....	25
Tabela 3	Doses dos herbicidas utilizadas para o experimento de curva dose resposta. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	26
Tabela 4	Dose do herbicida que promove o controle de 50% da população (C <sub>50</sub> ) e fator de resistência (FR) de biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ), em resposta a aplicação de diferentes doses do herbicida glifosato, avaliado aos 28 DAT. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	30
Tabela 5	Dose necessária para redução de 50% da massa da matéria seca (MS <sub>50</sub> ), com intervalos de confiança (IC) e fator de resistência (FR) dos biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) suscetível (Susc) e resistente (110), em resposta a aplicação de diferentes doses do herbicida glifosato, iodosulfurometílico e piroxsulam avaliado aos 28 dias após o tratamento (DAT). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	35
Tabela 6	Dose necessária para acúmulo de 50% de ácido chiquímico (I <sub>50</sub> ), com intervalos de confiança (IC) e fator de resistência dos biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) suscetível (Susc) e resistente (110), em resposta a aplicação de diferentes doses do herbicida glifosato, avaliado as 24, 48 e 96 horas após o tratamento (HAT), Capão do Leão/RS, 2017.....	46

Tabela 7	Controle (%) aos e 28 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT) biótipos de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) suscetível (Susc) e resistente (110), submetidos à aplicação de glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam isolados ou antecedido em trinta min da aplicação dos inibidores do cyt-P450 monooxigenase (PBO e malathion) e testemunha sem aplicação. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	54
Tabela 8	Estádios fenológicos que foram utilizados para contabilizar os dias após a emergência (DAE) que cada biótipo de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) necessita para atingi-los. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	59
Tabela 9	Diferenças relativas de produtividade (PR) e produtividade relativa total (PRT), para as variáveis número de afilhos, estatura, área foliar e massa seca da parte aérea, nas proporções plantas de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) resistente (110) e suscetível (Susc). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	75
Tabela 10	Respostas para número de afilhos, estatura, área foliar e matéria seca da parte aérea de biótipo de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) resistente (110) competindo com biótipo suscetível (Susc) sob diferentes proporções de plantas. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	76
Tabela 11	Índices de competitividade de biótipo de azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> ) resistente (110) e suscetível (Susc), expresso por competitividade relativa (CR), coeficientes de agrupamento relativo (K) e de competitividade (C). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.....	76

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO I Resistência múltipla de biótipos <i>Lolium multiflorum</i> L aos herbicidas glifosato (EPSPs), iodosulfurom-metílico e piroxsulam (ALS).....</b>	<b>22</b>
2.1	Introdução.....	22
2.2	Material e métodos.....	23
2.3	Resultados e discussão.....	27
2.4	Conclusões.....	36
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO II Mecanismo de resistência de <i>Lolium multiflorum</i> L. aos herbicidas glifosato (EPSPs), iodosulfurom-metílico e piroxsulam (ALS).....</b>	<b>37</b>
3.1	Introdução.....	37
3.2	Material e métodos.....	39
3.2.1	Bioensaio de quantificação <i>in vivo</i> de ácido chiquímico.....	39
3.2.2	Determinação <i>in vitro</i> da atividade da enzima acetolactato sintase (ALS).....	40
3.2.3	Metabolização de glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam	42
3.3	Resultados e discussão.....	43
3.3.1	Bioensaio de quantificação <i>in vivo</i> de ácido chiquímico.....	43
3.3.2	Determinação <i>in vitro</i> da atividade da enzima acetolactato sintase (ALS).....	48
3.3.3	Metabolização de glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam.....	53
3.4	Conclusões.....	55



<b>4</b>	<b>CAPÍTULO III Valor adaptativo e habilidade competitiva de biótipos de <i>Lolium multiflorum</i> L. resistentes aos herbicidas glifosato (EPSPs), iodosulfurom-metílico e piroxsulam (ALS).....</b>	<b>56</b>
<b>4.1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>56</b>
<b>4.2</b>	<b>Material e métodos.....</b>	<b>58</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Desenvolvimento fenológico dos biótipos.....</b>	<b>58</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Valor adaptativo.....</b>	<b>59</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Habilidade competitiva.....</b>	<b>60</b>
<b>4.3</b>	<b>Resultados e discussão.....</b>	<b>63</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Desenvolvimento fenológico dos biótipos.....</b>	<b>63</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Valor adaptativo.....</b>	<b>65</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Habilidade competitiva.....</b>	<b>73</b>
<b>4.4</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>77</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
	<b>Referências.....</b>	<b>79</b>
	<b>Vita.....</b>	<b>91</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O azevém (*Lolium multiflorum* L.) é planta de inverno, com ciclo anual ou bianual, ereta, glabra, capacidade de afilhamento, e morfologicamente variável (CARÁMBULA, 2007). Possui folhas finas e laminadas, inflorescência em forma de espiga do tipo dística, com 15 a 20 cm de comprimento, com espiguetas onde as flores estão inseridas. Cada flor possui duas glumas, uma pálea e uma lema que envolve a cariopse. Possui fecundação cruzada, sistema radicular altamente ramificado e denso com muitas raízes adventícias e fibrosas (POLOK, 2007; LORENZI, 2008; AGOSTINETTO; VARGAS, 2009).

É a principal forrageira de inverno nos sistemas agrícolas do Sul do Brasil, devido às qualidades bromatológicas, baixo custo de produção e potencial de ressemeadura natural (AGUINAGA et al., 2008). Entretanto, pode ser considerada planta daninha quando presente nos demais cultivos de inverno causando sérios prejuízos à produtividade e a qualidade dos grãos colhidos devido à elevada capacidade de competição (RIGOLI et al., 2008).

Devido a sua praticidade, eficiência e menor custo quando comparado a outros métodos, o controle químico se tornou o principal método de manejo para o azevém. Porém, o uso intenso e repetido de mesma molécula herbicida, especialmente em áreas cultivadas com cereais de inverno selecionou biótipos de azevém resistentes, tornando o seu controle mais oneroso e difícil, devido ao baixo número de moléculas herbicidas existentes (POWLES, YU, 2010; KAUNDUN et al., 2013). Atualmente, estudos comprovaram a ocorrência de biótipos de azevém com resistência simples a herbicidas inibidores da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), acetolactato sintase (ALS) e acetil coenzima A carboxilase (ACCase), e mais recentemente com resistência múltipla aos herbicidas inibidores da EPSPs e ACCase e também ALS e ACCase (HEAP, 2017).

O manejo do azevém resistente torna-se difícil já que muitas populações estão adquirindo resistência aos poucos herbicidas pós-emergentes que existem no mercado (KAUNDUN et al., 2013). Em 75 populações de azevém coletadas no leste de Washington e Norte de Idaho, 25% são resistentes a três grupos químicos dos inibidores da ALS e 27% possuem resistência múltipla, aos inibidores de ALS e da ACCase (RAUCH et al., 2010).

O glifosato é um herbicida sistêmico, não seletivo, translocado via xilema e floema. Atua inibindo a enzima EPSPs bloqueando a rota do ácido chiquímico que faz parte da rota de produção de aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, e conseqüentemente de seus produtos finais como vitaminas, auxinas, plastoquinonas, lignina, alcalóides, compostos fenólicos (flavonóides). Estes compostos são essenciais as plantas pois atuam tanto no metabolismo primário responsável pelo desenvolvimento e também no metabolismo secundário responsável pelo sistema de defesa das plantas. Desta forma, as plantas suscetíveis ao herbicida morrem pela falta dos aminoácidos essenciais o que ocasiona o acúmulo de ácido chiquímico, enquanto que, plantas resistentes ao glifosato acabam não acumulando o mesmo. O acúmulo de ácido chiquímico causa estresse oxidativo nas plantas através da produção de espécies reativas de oxigênio que são moléculas tóxicas altamente reativas, causando danos às estruturas celulares e até a morte celular (GILL ;TUTEJA, 2010)

O iodosulfurom-metílico e o piroxsulam pertencem ao mecanismo de ação dos inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). O primeiro pertence ao grupo químico das sulfonilureias (SUs) e o segundo ao grupo das triazolopirimidinas (TPs). A atuação destes herbicidas reduz ou bloqueia a atividade catalítica da enzima ALS resultando na deficiência desses aminoácidos e, por conseqüência, interrompe a síntese de proteínas, interferindo na síntese de DNA e no crescimento celular (TAN, 2006).

Existem dois tipos de resistência: a resistência cruzada e a múltipla. A resistência cruzada ocorre quando um biótipo é resistente a um único mecanismo de ação herbicida, pertencentes a dois ou mais grupos químicos, com um ou mais mecanismos de resistência. Já a resistência múltipla ocorre quando o biótipo é resistente a dois ou mais mecanismos de ação herbicida devido a um ou mais mecanismos de resistência (AGOSTINETTO; VARGAS, 2014).

Os mecanismos que conferem a resistência podem estar ou não relacionados com o local de ação dos herbicidas, originando a seguinte classificação: resistência relacionada ao local-alvo (*Target site resistance* - TSR) e resistência não relacionada ao local-alvo (*Non Target site resistance* - NTSR) (YU e POWLES 2014).

A TSR inclui os mecanismos de resistência conferidos por alterações no gene que codifica a enzima alvo, reduzindo a eficácia do herbicida em inibir o sítio ativo enzimático; aumentando a expressão gênica ou aumentando a atividade intrínseca da enzima alvo, compensando a ação inibitória do herbicida (MASSA et al., 2011; YU, Q.; HAN, H.; VILA-AIUB, M.M., 2010). O NTSR engloba mecanismos diversos, incluindo absorção reduzida, translocação diferencial, sequestro e metabolização das moléculas herbicidas e dos compostos tóxicos gerados pela ação do herbicida como os radicais livres (DELYE 2013).

A resistência associada à alteração no local de ação do herbicida pode representar mudança na funcionalidade da enzima, resultando em insuficiente ou excessivo produto da biossíntese (VILA-AIUB et al., 2009). A alteração na enzima ALS pode resultar em mudança de afinidade tanto com o herbicida quanto pelos substratos nas rotas que a ALS está envolvida. A ocorrência de mudanças na ecologia e fisiologia das plantas ocorrem em poucos tipos de mutação e normalmente são as mutações que ocorrem com menor probabilidade (YU; HAN; VILA-AIUB, 2010; LI et al., 2013). Isso explica porque a evolução nos casos de resistência aos herbicidas inibidores da enzima ALS é a mais pronunciada, ou seja, a alteração mantém a funcionalidade normal da planta, sem resultar em custo adaptativo (YU; HAN; VILA-AIUB, 2010).

A maior parte dos casos de resistência aos inibidores da enzima ALS relatados envolvem único ponto de mutação no gene alvo, que reduz a afinidade da enzima ao herbicida (BURGOS et al., 2013). Alterações no local de ação geralmente decorrem de mutações nos genes que codificam a enzima (DEVINE; SHUKLA, 2000), resultando em redução de sua afinidade com os inibidores, porém, com ausência ou reduzida perda da função enzimática (TRANDEL; WRIGHT, 2002).

Muitos dos estudos visam apenas elucidar o mecanismo relacionado ao local alvo, e não examinam a resistência relacionada ao local não alvo (NTSR) de ação do herbicida (AHMAD-HAMDANI et al., 2013; BURGOS et al., 2013). Em alguns casos, ambos mecanismos podem estar envolvidos, como no caso de *Avena* spp. resistente aos inibidores da ACCase (AHMAD-HAMDANI et al., 2013). Portanto, é necessário

examinar tanto o local alvo, como não alvo dos herbicidas, considerando a possibilidade de coexistência (AHMAD-HAMDANI et al., 2013).

A comparação do valor adaptativo e habilidade competitiva do biótipo resistente em relação ao suscetível são fatores que podem influenciar de forma significativa na taxa de evolução da resistência e/ou frequência inicial, ou mesmo na manutenção da proporção de plantas resistentes dentro da população quando da ausência da pressão de seleção do herbicida (JASIENIUK; BRÛLÉ-BABEL; MORRISON, 1996). O valor adaptativo do biótipo refere-se ao sucesso evolutivo que combina as características de sobrevivência e reprodução (HOLT; RADOSEVICH, 1983), ou seja, é a capacidade que o biótipo possui, dentro da população de plantas daninhas, em manter ou aumentar sua proporção ao longo do tempo (CHRISTOFFOLETI; WESTRA; MOORE, 1997).

Para comparar o valor adaptativo entre biótipos resistentes e suscetíveis, frequentemente são utilizadas taxas de crescimento visando detectar diferenças entre biótipos (HOLT; RADOSEVICH, 1983). Além desses estudos, é importante avaliar a habilidade competitiva dos biótipos (WARWICK; BLACK, 1994), pois biótipos mais adaptados são normalmente mais competitivos e capazes de aumentar sua proporção ao longo do tempo, eliminando os indivíduos menos aptos a ocupar determinado nicho ecológico (CHRISTOFFOLETI; WESTRA; MOORE, 1997).

Identificar as populações de plantas daninhas resistentes caracterizando-as e também conhecer o mecanismo pelo qual as plantas de azevém apresentam redução de controle ao glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam é fundamental para propor estratégias de manejo visando evitar a disseminação da resistência dessa planta daninha.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivos: avaliar a ocorrência de resistência múltipla e cruzada em biótipos de azevém aos herbicidas glifosato (EPSPs), iodosulfurom-metílico e piroxsulam (ALS); verificar o possível mecanismo de resistência através do acúmulo de chiquimato, atividade da enzima ALS e da resposta dos biótipos de azevém à aplicação de inibidores do metabolismo da cyt-P450 monooxigenase; e, estimar o valor adaptativo e habilidade competitiva dos biótipos de azevém suscetível e resistentes aos herbicidas glifosato (EPSPs), iodosulfurom-metílico e piroxsulam (ALS).

## **2 CAPÍTULO I – Resistência múltipla de biótipos *Lolium multiflorum* L. aos herbicidas glifosato (EPSPs), iodosulfurom-metílico e piroxsulam (ALS)**

### **2.1 Introdução**

O azevém (*Lolium multiflorum* L.) é planta anual, herbácea, alógama e amplamente utilizado como planta forrageira (CARÁMBULA, 2007). Esta espécie adapta-se bem em solos de baixa e média fertilidade, responde à adubação, é de fácil multiplicação e dispersão e está presente em praticamente todas as lavouras, pomares e vinhedos da região Sul do Brasil (VARGAS; MORAES; BERTO, 2007). Embora o azevém possa ser reproduzido por afilhos, a principal forma de reprodução é por meio de sementes, que permanecem viáveis no banco de sementes do solo por dois a três anos (GALVAN; RIZZARDI, 2012).

Seu desenvolvimento ocorre entre os meses de março e novembro na região Sul do Brasil, sendo considerada uma das principais plantas daninhas das culturas de inverno, especialmente no trigo (VARGAS et al., 2007). A alta capacidade competitiva do azevém em relação ao trigo resulta em sérios prejuízos à produtividade e a qualidade dos grãos colhidos (RIGOLI et al., 2008), podendo reduzir a produção do trigo em até 70%. (VARGAS et al., 2013a).

Com a seleção de azevém resistente ao glifosato o controle químico do azevém passou a ser realizado com herbicidas inibidores da ACCase, na dessecação e pré-semeadura das culturas, e inibidores da ALS em pós-emergência do trigo e do milho. O herbicida iodosulfurom-metílico, um dos poucos herbicidas seletivos para aplicação em pós-emergência do trigo, passou a ser usado amplamente para controle dessa espécie daninha. Isso ocasionou em maior da pressão de seleção resultando no aumento dos casos de populações resistentes ao iodosulfurom-metílico (MARIANI

et al., 2016a). Em substituição ao iodosulfurom-metílico, os produtores passaram a usar o piroxsulam, resultando no surgimento de plantas resistentes num curto período de tempo.

Os relatos de resistência de azevém se tornaram frequentes nos últimos anos. No Brasil estão registrados biótipos com resistência simples aos inibidores das enzimas EPSPs, ACCase e ALS e resistência múltipla a EPSPs e ACCase, ACCase e ALS e EPSPs e ALS (dados deste trabalho) (HEAP, 2017). Este fato preocupa, pois, as alternativas de manejo químico das populações resistentes são cada vez mais escassas. Além disso, as falhas de controle resultam em perdas de produtividade das culturas e aumento do custo de produção, em função da necessidade de aplicação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação, ou o uso de ferramentas do manejo integrado.

Para confirmar a ocorrência de resistência, deve-se realizar ensaios com curva dose-resposta, determinando-se a dose necessária para promover o controle de 50% da população ( $C_{50}$ ) e a dose necessária para reduzir em 50% a produção de massa da matéria seca da população ( $MS_{50}$ ) (GAZZIERO et al., 2009). O conhecimento destas variáveis permite o cálculo do fator de resistência (FR), que se refere ao número de vezes que a dose necessária para o controle da população resistente é maior do que a dose que causa o mesmo efeito na população suscetível (HALL; STROME; HORSMAN, 1998).

Diante disso, este trabalho teve por hipótese que há biótipos de azevém com resistência múltipla aos herbicidas glifosato (EPSPs), iodosulfurom-metílico e piroxsulam (ALS) e que estes necessitam maior dose dos herbicidas que o biótipo suscetível para controlar 50% da população e/ou reduzir em 50% a produção de massa seca da parte aérea. Já o objetivo foi avaliar e comprovar a ocorrência de resistência múltipla e cruzada em biótipos de *L. multiflorum* aos herbicidas glifosato (EPSPs), iodosulfurom-metílico e piroxsulam (ALS).

## 2.2 Material e métodos

Foram conduzidos três experimentos, em casa de vegetação, no Centro de Estudos em Herbologia (Ceherb), da Universidade Federal de Pelotas, Capão-do-Leão-RS. O experimento I (EI) foi realizado de março a junho de 2016 com objetivo de identificar biótipos com resistência múltipla. Foram avaliados 26 biótipos oriundos

de diversas regiões do Rio Grande do Sul e do Paraná, que sobreviveram a aplicações de campo com glifosato e iodosulfurom-metílico e assim suspeitos de possuírem resistência a esses herbicidas (Tabela 1). Para avaliar os biótipos as sementes coletadas foram semeadas em bandejas de polietileno (9,7cm de altura x 30cm de largura x 49cm de comprimento), contendo substrato comercial Mac Plant®, com espaçamento entre linhas de 10cm.

Tabela 1 - Localização dos biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) submetidos a aplicação de 2160g e.a. ha-1 de glifosato, de 5g i.a. ha-1 de iodosulfurom-metílico. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2016.

Município	Biótipo	Coordenadas Geográficas	
		Latitude	Longitude
Victor Graeff	16	28°34'43"	52°44'03"
Espumoso	21	28°44'10"	52°48'03"
Santo Augusto	26	29°57'27"	53°49'57"
Santo Augusto	28	27°55'04"	53°50'44"
Salto do Jacuí	37	29°05'33,5"	53°11'47,5"
Salto do Jacuí	38	29°04'37,5"	53°07'39,3"
Jacuizinho	39	29°04'37,7"	53°03'49,7"
Jari	40	29°32'97,3"	54°32'13,59"
Jari	41	29°32'97,3"	54.32,1'35,9"
Cruz Alta	42	28°34'59"	53°37'27"
Jóia	43	28°83'15,88"	54°06'21,04"
Jóia	44	28°83'15,88"	54°06'21,04"
Salto do Jacuí	45	29°07'28"	53°7'52"
Salto do Jacuí	46	29°07'25"	53°7'56"
Boa vista do Cadeado	47	28°40'38"	53°48'20"
Salto do Jacuí	48	29°05'30,9"	53°12'12,4"
Tupanciretã	49	28°59'67,5"	54°17'047"
Boa Vista do Cadeado	50	28°40'39"	53°48'17"
Tupanciretã	51	28°59'67,5"	54°17'047"
Campo Bonito	52	25°08'99,22"	52°97'59,96"
Cascavél	53	25°18,6'06,60"	53°27,8'56,90"
Vera Cruz do Oeste	54	23°06'22,11"	53°96'37,04"
Cascavél	55	24°96,7'40,10"	53°20,3'32,80"
Salto do Jacuí	60	29°13'54"	53°21'75"
Roncador	110	24°35'23,93"	52°15'02,12"
Roncador	Susc	24°31'08,59"	52°15'38,8"



O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado, com quatro repetições. Quando as plantas atingiram estágio vegetativo de 3-4 folhas realizou-se a aplicação dos tratamentos (Tabela 2). Utilizou-se a maior dose registrada de cada herbicida, uma vez que para classificar uma planta como resistente a herbicidas, ela deverá sobreviver e se reproduzir após exposição à dose de registro do produto para controle da espécie, obedecendo aos critérios de aplicação (estádio vegetativo indicado, condições de clima, entre outros) (GAZZIERO et al., 2009).

Tabela 2- Doses dos herbicidas utilizadas para a seleção dos biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) suspeitos de resistência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2016.

Glifosato (g e.a ha <sup>-1</sup> )	Iodosulfurom-metílico (g i. a ha <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	Piroxulam (g i. a ha <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>
2160	5	18

<sup>1</sup>0,3% v/v de Hoefix® e <sup>2</sup>0,4% v/v óleo vegetal (Veget Oil®).

A aplicação dos tratamentos foi realizada com pulverizador costal, pressurizado a CO<sub>2</sub>, calibrado para proporcionar volume de aplicação de 120L ha<sup>-1</sup>, equipado com pontas de pulverização do tipo leque 110.015. No momento da aplicação a temperatura era de 23°C, com umidade relativa de 71%.

Aos 28 dias após o tratamento (DAT) foi avaliado o controle visual (%) de acordo com SBCPD (1995), onde 0 significou ausência de sintomas e 100 a morte das plantas. Os biótipos que sobreviveram aos tratamentos foram identificados como resistentes e os que foram controlados, como suscetíveis. Os dados obtidos foram analisados através da estatística descritiva, e por fim, foram selecionados os biótipos com maior sensibilidade (Susc) e aqueles com menor sensibilidade (110) para serem usados nos estudos posteriores. Na escolha dos biótipos também foi considerado a maior proximidade geográfica possível, buscando-se reduzir efeito do ambiente e diversidade genética.

O experimento II (EII) foi realizado no período de março a junho de 2017 com o objetivo de comprovar a resistência das plantas testadas e selecionar as plantas mãe dos biótipos para a aplicação da curva dose-resposta (EIII). O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados, com quatro repetições. As unidades experimentais constituíram-se de vasos plásticos com capacidade volumétrica de 700mL, os quais continham substrato comercial Mac Plant®. Inicialmente, foram semeadas quatro sementes por vaso e, posteriormente, quando as plantas apresentavam duas folhas, realizou-se desbaste, deixando-se uma planta por vaso.

Quando as plantas atingiram estágio vegetativo de seis afilhos realizou-se a separação de quatro deles. Assim, obteve-se a planta mãe que ficou com dois afilhos e não recebeu aplicação de herbicida, e os quatro afilhos que foram separados para a aplicação dos herbicidas para confirmação da resistência. Os quatro afilhos foram imediatamente transplantados, de forma individual, em novos vasos, obtendo-se um afilho por vaso (repetição) contendo o mesmo substrato. Posteriormente, aguardou-se período de 20 dias, para enraizamento dos afilhos, e aplicou-se os tratamentos herbicidas (Tabela 2). Foi realizada aplicação dos tratamentos e avaliação do controle de forma semelhante àquela descrita anteriormente.

No experimento III (EIII) o objetivo foi avaliar e comprovar a ocorrência de resistência múltipla e cruzada do biótipo com suspeita de resistência aos herbicidas glifosato (EPSPs), iodosulfurom-metílico e piroxsulam (ALS). Para este experimento as plantas mãe, cujos afilhos sobreviveram a aplicação (EII) comprovando serem resistentes, foram transplantados para vasos com capacidade volumétrica de 4L, contendo solo tipo Argissolo Vermelho-Amarelo e substrato comercial Mac Plant® na proporção de 3:1. Adotou-se esse procedimento para todas as plantas mãe dos biótipos avaliados. Induziu-se nas plantas transplantadas a produção de afilhos com a aplicação de adubação nitrogenada e desbaste. Novamente os afilhos produzidos foram separados e transplantados para vasos de 700ml contendo solo e substrato. 20 dias após o transplante, organizou-se os mesmos para as aplicações dos tratamentos herbicidas que compuseram as curvas dose-resposta (Tabela 3).

Tabela 3 - Doses dos herbicidas utilizadas para o experimento de curva dose-resposta. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2017.

Glifosato (g e.a ha <sup>-1</sup> )	Iodosulfurom-metílico (g i. a ha <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	Piroxsulam (g i. a ha <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>
0	0	0
90	1,25	4,5
180	2,5	9
360	5	18
720	10	36
1440	20	72
2880	40	144
5760	80	288
11520	160	576

<sup>1</sup>0,3% v/v de Hoefix® e <sup>2</sup>0,4% v/v óleo vegetal (Veget Oil®).

As variáveis avaliadas nesse experimento foram controle (C) e massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA). O C foi avaliado visualmente, por dois

avaliadores, aos 14, 21 e 28 DAT, utilizando-se escala percentual de acordo com SBCPD (1995). Aos 28 DAT, realizou-se a colheita das plantas, cortando-se rente à superfície do solo, para determinação da MMSPA. O material vegetal foi submetido à secagem em estufa de circulação forçada de ar a 60°C, até obter-se massa constante, quando o material foi pesado e o valor transformado para MMSPA planta<sup>-1</sup>. Os resultados da MMSPA foram transformados para valores percentuais em relação a testemunha, considerada 100%.

Os dados foram analisados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e, posteriormente, submeteu-se os mesmos à análise de variância individual para cada herbicida ( $p \leq 0,05$ ). No caso de ser constatada significância estatística, realizou-se análise de regressão para doses e biótipos, com auxílio do programa SigmaPlot 12.5 (SIGMAPLOT, 2013), ajustando-se os dados à equação de regressão sigmoideal do tipo logístico (SEEFELDT; JENSEN; FUERST, 1995).

$$y = a / [1 + (x / x_0)^b]$$

onde:  $y$  = porcentagem de controle ou de redução da MMSPA;  $x$  = dose do herbicida; e  $a$ ,  $x_0$  e  $b$  = parâmetros da equação, sendo que  $a$  é a diferença entre os pontos máximo e mínimo da curva,  $x_0$  é a dose que proporciona 50% de resposta da variável e  $b$  é a declividade da curva.

Os valores da dose necessária para promover o controle de 50% da população ( $C_{50}$ ) e da dose necessária para reduzir em 50% a produção de massa da matéria seca da população ( $MS_{50}$ ) foram obtidos através do cálculo aritmético do valor necessário para promover 50% da resposta, de acordo com os parâmetros gerados nas equações das curvas. A partir dos valores de  $C_{50}$  e  $MS_{50}$ , obtiveram-se o fator de resistência (FR) que se refere ao número de vezes que a dose necessária para o controle da população resistente é maior do que a dose que causa o mesmo efeito na população suscetível para cada biótipo suspeito de resistência em comparação com o suscetível. Para utilização do FR, foi necessário verificar o intervalo de confiança ( $p \leq 0,05$ ) do biótipo suscetível em relação ao resistente.

### 2.3 Resultados e discussão

No EI, verificou-se que, dentre os 26 biótipos estudados, somente um sobreviveu as aplicações de glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam, correspondendo a 3,85 % dos biótipos testados (Tabela 1). Seguindo-se os

critérios estabelecidos no material e métodos, foi escolhido o biótipo 110 como resistente e o Susc como sensível.

No EII, não se verificou sintomas de fitotoxicidade nos afillhos do biótipo 110 em resposta aos tratamentos contendo 2160g e.a. ha<sup>-1</sup> de glifosato, 5g i.a. ha<sup>-1</sup> de iodosulfurom-metílico e 18g i.a ha<sup>-1</sup> de piroxsulam resultando em não significância estatística dos dados. Estes resultados evidenciam que o biótipo possui resistência aos três herbicidas avaliados, confirmando o primeiro caso de azevém com resistência múltipla aos inibidores da ALS e EPSPs. O biótipo Susc foi controlado por todos os herbicidas.

Para experimento de curva de dose-resposta (EIII), a análise de variância demonstrou interação entre os fatores biótipos e doses para todas as variáveis analisadas, indicando que dentro de cada biótipo há resposta diferencial a cada dose herbicida aplicada (Figura 1, 2, 3, 4, 5 e 6; Tabela 4 e 5). Observou-se comportamento sigmoidal ao longo dos períodos de avaliação para as variáveis controle e MMSPA para glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam. Os valores do coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) variaram de 0,96 a 0,98, demonstrando alto ajuste dos dados ao modelo. A partir das equações, calcularam-se os valores de C<sub>50</sub> e MS<sub>50</sub> para os biótipos de azevém suscetível (Susc) e resistente (110).

Para o biótipo Susc aos 28 DAT, obteve-se 50% de controle com a dose de 86g e.a. ha<sup>-1</sup> de glifosato (Figura 1). Já para o biótipo 110, na mesma época de avaliação, obteve-se 50% de controle com a dose de 1358g e.a. ha<sup>-1</sup> de glifosato. Ou seja, foi necessária dose 50 vezes maior de glifosato para se obter o mesmo efeito no biótipo resistente do que para o suscetível. Salas et al. (2015) identificaram que para controlar 50% do biótipo sensível de *L. perenne* spp *multiflorum* foram necessárias doses de glifosato de 184g e.a. ha<sup>-1</sup> e de 1524 a 2719g e.a. ha<sup>-1</sup> para os biótipos resistentes. Resultados semelhantes foram encontrados para biótipos de *L. rigidum* onde foram necessárias 117,74 e 2712,05g e.a. ha<sup>-1</sup> de glifosato para controlar 50% do biótipo suscetível e resistente, respectivamente (FERNÁNDEZ-MORENO; BASTIDA; DE PRADO, 2017).

A translocação reduzida do herbicida e a mutação na enzima alvo (EPSPs) tem sido os mecanismos mais comuns em plantas daninhas resistentes ao glifosato (POWLES; PRESTON, 2006). A quantidade reduzida de glifosato que atinge o local

alvo, devido ao rápido sequestro no vacúolo, foi relatado em *Lolium* spp, conferindo um FR de 14 vezes ao glifosato (GE et al., 2012).

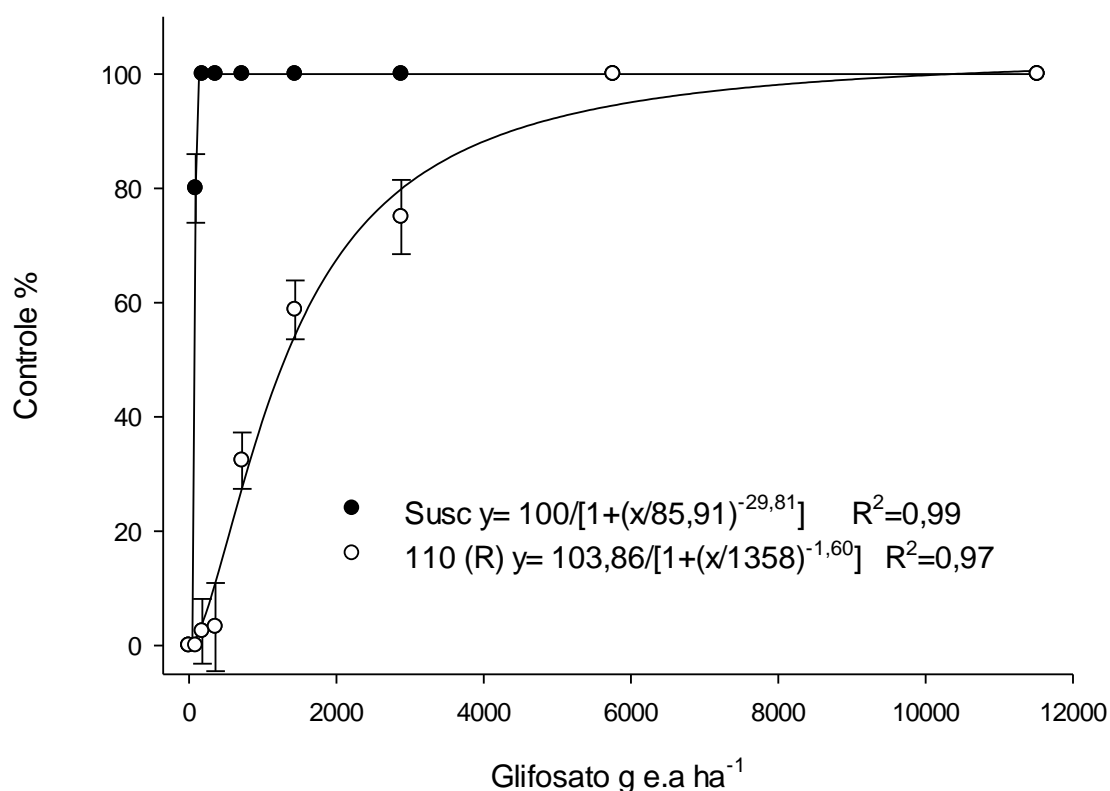


Figura 1 – Controle (%) de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) suscetível (Susc) e resistente (110), em função da aplicação de glifosato, aos 28 dias após o tratamento (DAT). FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2017. Os pontos representam os valores médios das repetições e as barras verticais os intervalos de confiança ( $p \leq 0,05$ ).

Na avaliação da MMSPA, verificou-se comportamento decrescente nas curvas sigmoidais, indicando que o aumento na dose do herbicida glifosato para ambos os biótipos, Susc e 110, reduziu o acúmulo de MMSPA (Figura 2). No entanto, esta redução da MMSPA foi mais pronunciada no biótipo suscetível.

A dose de glifosato que causou 50% de redução da MMSPA ( $MS_{50}$ ) do biótipo Susc foi de 6,15g e.a.  $ha^{-1}$  e do biótipo 110 foi de 886g e.a.  $ha^{-1}$ , respectivamente. Desta forma, é necessária dose 144 vezes maior para o biótipo 110 em comparação ao Susc, para se obter o mesmo resultado (Tabela 5). A dose de glifosato necessária para redução de 50% da MMSPA de biótipos de *Lolium perene* spp *multiflorum* resistentes variou de 726 a 1264g e.a.  $ha^{-1}$  (SALAS et al., 2015) e foi de 637,83g e.a.  $ha^{-1}$  para biótipo resistente de *Lolium rigidum* (FERNÁNDEZ-MORENO; BASTIDA; DE PRADO, 2017).

Ao analisar o valor do FR para o glifosato, observou-se que para se obter controle equivalente do biótipo 110 aos 28 DAT foi necessária dose de glifosato 15,8 vezes àquela necessária para o biótipo Susc (Tabela 4). Resultados similares foram encontrados em estudos com biótipos de *Lolium perene* spp. *multiflorum* resistentes a glifosato que tiveram FR variando de 8 a 15 (SALAS et al., 2015) e em *Lolium rigidum* com FR de 23,04 (FERNÁNDEZ-MORENO; BASTIDA; DE PRADO, 2017). Já, para o iodosulfurom-metílico e piroxsulam não foi possível calcular o FR pois ele é calculado partir dos valores de  $C_{50}$  e as doses utilizadas não atingiram 50% de controle para o biótipo resistente.

Tabela 4 - Dose do herbicida que promove o controle de 50% da população ( $C_{50}$ ) e fator de resistência (FR) de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*), em resposta a aplicação de diferentes doses do herbicida glifosato, avaliado aos 28 DAT. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2017.

Biótipo	g e.a. ha <sup>-1</sup>	$C_{50}$	
		95 % IC	FR <sup>1</sup>
Susc	85,92	63,44 - 106,56	-
110	1358,2	1149 - 1566	15,8

<sup>1</sup>Fator de resistência ao herbicida glifosato dos biótipos de azevém, obtido da divisão do  $I_{50}$  do biótipo resistente (110) em relação ao biótipo suscetível ao herbicida (Susc).

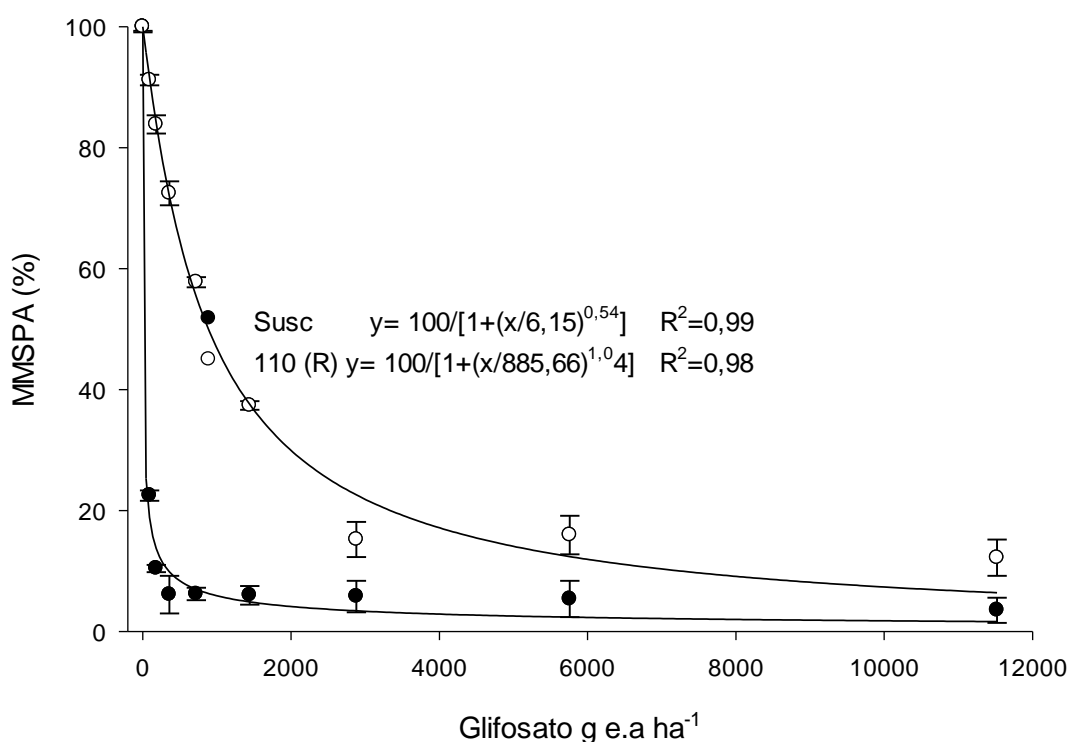


Figura 2 – Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) suscetível (Susc) e resistente (110), em resposta a aplicação de diferentes doses do herbicida glifosato avaliada aos 28 DAT. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2017. Os pontos representam os valores médios das repetições e as barras verticais os intervalos de confiança ( $p \leq 0,05$ ).

O controle do biótipo 110 utilizando os herbicidas iodosulfurom-metílico e piroxsulam foi insatisfatório, atingindo níveis inferiores a 40% (Figura 3 e 4). A aplicação de 160g i.a ha<sup>-1</sup> de iodosulfurom-metílico e 576g i.a ha<sup>-1</sup> de piroxsulam, que correspondem a 32 vezes a dose comercial, não foram eficientes, resultando em menos de 50% de controle nesse biótipo (Figura 3 e 4). Esse comportamento geralmente indica que o mecanismo de resistência esteja relacionado com mutação no gene que codifica a ALS resultando na insensibilidade da enzima ALS aos herbicidas iodosulfurom-metílico e piroxsulam (YU; POWLES, 2013a) pois o aumento da dose não resulta em aumento de controle.

O C<sub>50</sub> do biótipo Susc foi de 1,3g i.a ha<sup>-1</sup> de iodosulfom-metílico, de 3g i.a.ha<sup>-1</sup> de piroxsulam e o C<sub>90</sub> ocorreu a partir de 2g i.a.ha<sup>-1</sup> de iodosulfurom-metílico e 5g i.a.ha<sup>-1</sup> de piroxsulam (Figura 4). Mariani et al. (2016a), trabalhando com *Lolium multiflorum* obtiveram C<sub>50</sub> de 1,93g i.a ha<sup>-1</sup> de iodosulfurom-metílico. Em outro trabalho realizado com *Lolium multiflorum* Ulzurrun e Leaden, (2012) obtiveram um FR de 26,1 utilizando o piroxsulam, demonstrando alto nível de resistência aos herbicidas inibidores da ALS.

Os diferentes resultados obtidos pelos autores podem estar relacionados com as diferentes condições ambientais dos locais onde os experimentos foram realizados e/ou com as diferentes formulações dos herbicidas e condições de aplicação e com o estágio vegetativo dos biótipos e, também, com o mecanismo que confere a resistência.

O alto grau de resistência evidenciado no biótipo 110 indicou que o mecanismo de resistência envolvido possa ser resultante da ação de dois ou mais mecanismos de resistência, pois o mesmo apresentou comportamento diferente mediante a aplicação dos inibidores da ALS e inibidor da EPSPs, sendo que a partir de 3900g e.a. ha<sup>-1</sup> de glifosato é possível obter controle acima de 90% do biótipo 110(Figura 1). Esse resultado evidenciou a possibilidade de estar ocorrendo resistência ao local não-alvo (NTSR) que pode ser devido principalmente a absorção reduzida, translocação diferencial ou sequestro e metabolização do herbicida ou dos compostos tóxicos gerados pela ação do herbicida responsáveis pela morte da planta. Já os inibidores da ALS mesmo em doses muito elevadas não apresentaram aumento do percentual de controle o que pode ser conferido pela mutação da enzima ALS que a torna insensível e impede qualquer ação do herbicida.

A explicação para níveis diferenciais de resistência pode estar relacionada com o aminoácido alterado na enzima ALS, que é capaz de afetar em diferentes graus a afinidade da enzima com a molécula herbicida (MARIANI et al., 2016a). Os herbicidas inibidores da ALS resultam de níveis extremamente elevados de resistência, frequentemente maiores que 100 (GRESSEL, 2000). Ou seja, são considerados altos em relação ao herbicida glifosato que geralmente possui fator de resistência baixo, apesar de Yu et al. (2015), terem encontrado fator FR de 182 para o glifosato (com base no  $C_{50}$ ) em trabalho realizado com *Eleusine indica*.

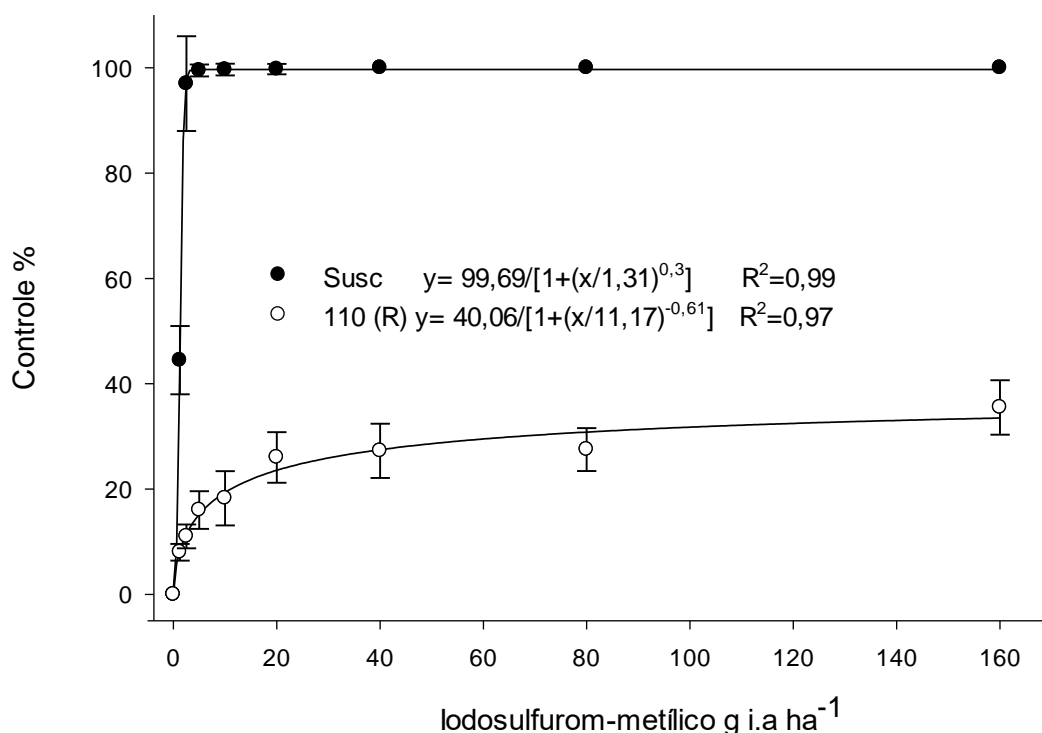


Figura 3 – Controle (%) de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) suscetível (Susc) e resistente (110), em função da aplicação de iodosulfurom-metílico, aos 28 dias após o tratamento (DAT). FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2017. Os pontos representam os valores médios das repetições e as barras verticais os intervalos de confiança ( $p \leq 0,05$ ).



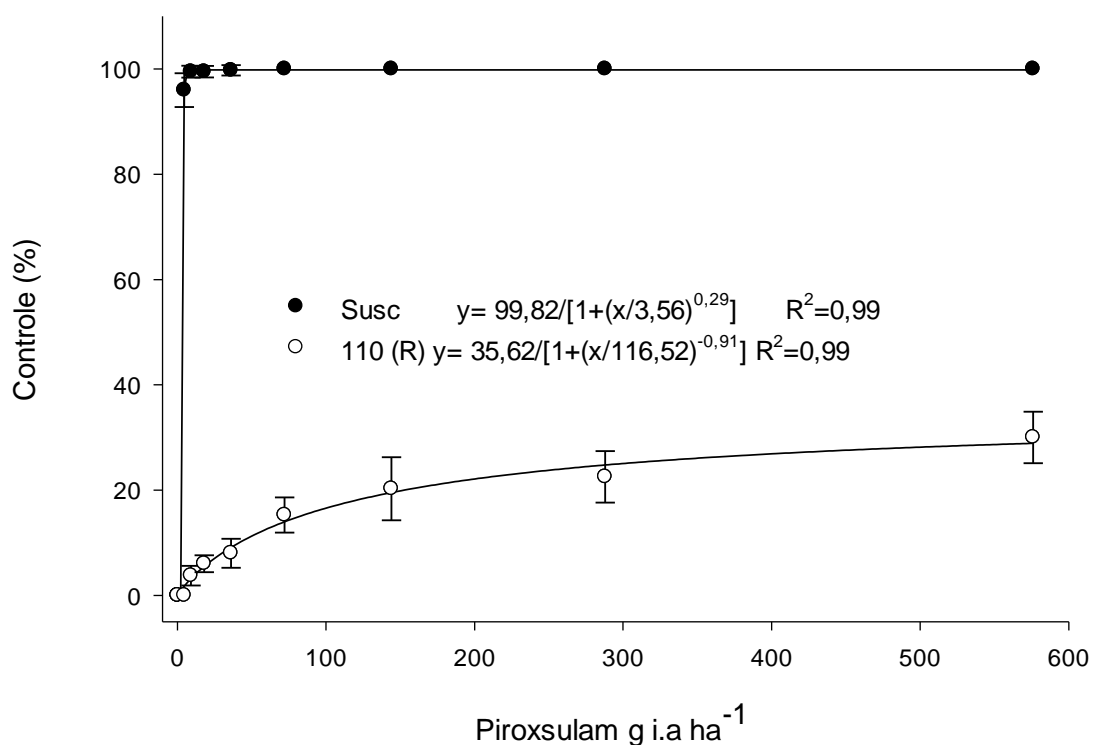


Figura 4 – Controle (%) de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) suscetível (Susc) e resistente (110), em função da aplicação de piroxulam, aos 28 dias após o tratamento (DAT). FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2017. Os pontos representam os valores médios das repetições e as barras verticais os intervalos de confiança ( $p \leq 0,05$ ).

Com relação a MMSPA, a  $MS_{50}$  do biótipo Susc foi de 0,17 e 2,15g i.a. ha<sup>-1</sup> para o iodosulfurom-metílico e piroxulam, respectivamente, e de 240 e 575g i.a. ha<sup>-1</sup> para o biótipo 110, obtendo-se FR de 1411,7 e 276,4 (Figura 5 e 6, tabela 5). As doses para controle do biótipo Susc ficaram abaixo das doses recomendadas em bula demonstrando que o mesmo tem alta sensibilidade a esses herbicidas.

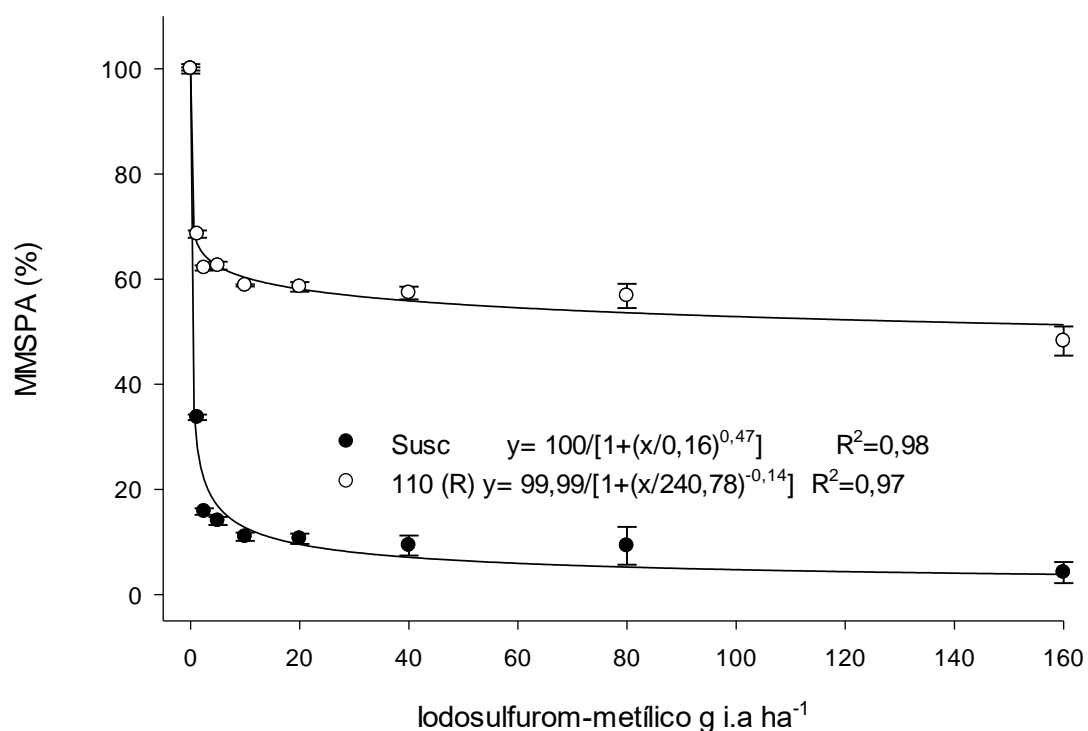


Figura 5 – Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) suscetível (Susc) e resistente (110), em resposta a aplicação de diferentes doses do herbicida iodosulfurom-metilico avaliada aos 28 DAT. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2017. Os pontos representam os valores médios das repetições e as barras verticais os intervalos de confiança (p≤0,05).

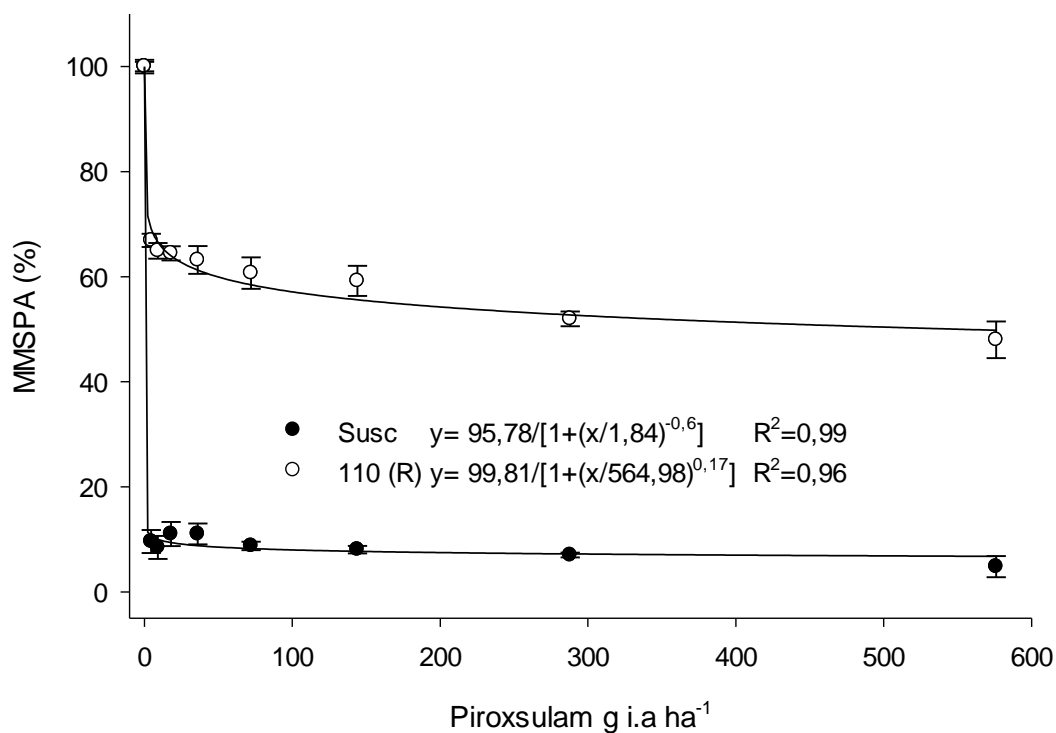


Figura 6 – Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) suscetível (Susc) e resistente (110), em resposta a aplicação de diferentes doses do herbicida piroxusulam avaliada aos 28 DAT. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2017. Os pontos representam os valores médios das repetições e as barras verticais os intervalos de confiança (p≤0,05).

Os valores de  $MS_{50}$  diferem dos valores de  $C_{50}$ , mas juntos, eles fornecem melhor imagem da resposta dessas plantas aos herbicidas utilizados. Estes nos informam sobre a proporção de plantas que se espera que sobrevivam a uma aplicação (SALAS et al., 2015).

Considerando os valores de  $MS_{50}$  e os FR calculados para os três herbicidas, confirmou-se que o biótipo testado possui resistência múltipla aos herbicidas inibidores da EPSPs e ALS e ainda resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS dos grupos das sulfonilureias (SUs) e triazolopirimidinas (TPs). Através de grande variedade de espécies de plantas daninhas, são documentados diferentes padrões de resistência cruzada aos inibidores de ALS dentro das populações devido às diferentes substituições em um dos oito resíduos de aminoácidos conservados (HAN et al., 2012; YU e POWLES 2014). De acordo com Devine e Eberlein, 1997, existe tendência geral de resistência cruzada entre herbicidas do grupo das SUs e TPs. Isso ocorre pois parece provável que as TPs se ligam a ALS de forma semelhante ao SUs. (COBB e READE., 2010).

Geralmente, o padrão de resistência cruzada é atribuído por uma dada mutação na enzima ALS e é inferido por sua posição no gene (YU; POWLES, 2013). Por exemplo, em plantas homozigotas de *R. raphanistrum* resistentes a ALS foi identificada mutação em Asp-376-Glu que resultou em  $FR > 100$  aos herbicidas dos grupos das SUs e TPs (com base em  $C_{50}$ ) (YU et al., 2012).

Tabela 5 – Dose necessária para redução de 50% da massa da matéria seca ( $MS_{50}$ ), com intervalos de confiança (IC) e fator de resistência (FR) dos biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) suscetível (Susc) e resistente (110), em resposta a aplicação de diferentes doses do herbicida glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam avaliado aos 28 dias após o tratamento (DAT). FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2017.

Biótipo	Glifosato		
	g i.a ha <sup>-1</sup>	95 % IC	FR <sup>1</sup>
Susc	6,15	0,5 - 11,8	-
110	886	775 - 996,6	144,06
Iodosulfurom-metílico			
Susc	0,17	0,05 - 0,29	-
110	240	90 - 389,94	1411,76
Piroxsulam			
Susc	2,15	0 - 4,89	-
110	575	276 - 874	267,44

<sup>1</sup>Fator de resistência dos biótipos de azevém, obtido da divisão do  $I_{50}$  do biótipo resistente (110) em relação ao biótipo suscetível ao herbicida (Susc).

A variabilidade genética natural existente em qualquer população de plantas daninhas é responsável pela fonte inicial de resistência (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2003). Assim, todas as populações de plantas daninhas, independente da aplicação de qualquer produto, provavelmente contêm plantas (biótipos) que são resistentes a herbicidas (KISSMANN, 1996). Já o acúmulo de mecanismos múltiplos de resistência é uma ocorrência comum, em particular nas espécies de polinização cruzada como o azevém, produzindo maiores níveis de resistência em resposta à pressão contínua de seleção do glifosato (SAMMONS; GAINES, 2014) o que aumenta a dificuldade do controle dessas plantas e também o gerenciamento da resistência nas lavouras.

Os casos de resistência múltipla estão se tornando cada vez mais constantes nos últimos anos reduzindo as opções de controle químico. Dessa forma manejo químico de azevém para estas populações deve ser mais criterioso e fundamentado em herbicidas com diferentes mecanismos de ação, pois como demonstrado o aumento da dose dos herbicidas utilizados não é economicamente viável. O uso de doses mais altas também aumenta a pressão de seleção o que acelera a evolução das populações resistentes (VARGAS et al., 2013b). Não obstante, o uso de diferentes métodos de controle de plantas daninhas (como, por exemplo, métodos físicos para evitar a produção de sementes dos biótipos resistentes) é fundamental para evitar a seleção, a multiplicação e a dispersão de plantas resistentes. Estudos mais aprofundados devem ser realizados de forma a identificar os possíveis mecanismos de resistência desses biótipos buscando realizar o manejo de forma mais adequada evitando a disseminação desses biótipos resistentes nas lavouras.

## **2.4 Conclusões**

O biótipo de azevém 110 possui resistência múltipla aos herbicidas glifosato (EPSPs), iodosulfurom-metílico e piroxsulam (ALS) e resistência cruzada aos herbicidas iodosulfurom-metílico e piroxsulam (ALS). O biótipo Susc é suscetível ao glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam.

### **3 CAPÍTULO II – Mecanismo de resistência de *Lolium multiflorum* L. aos herbicidas glifosato (EPSPs), iodosulfurom-metílico e piroxsulam (ALS)**

#### **3.1 Introdução**

O azevém (*Lolium multiflorum* L.) tem grande destaque por ser importante forrageira e também por ser fonte de palha para o sistema de plantio direto, sendo cultivada em diversas regiões de clima temperado (LUBBERSTEDT; SCHEJBEL; BACH, 2003). Por outro lado, apesar da sua importância, pode se constituir em uma planta daninha em culturas como o milho e o trigo (ROMAN et al., 2004), ou em pomares, especialmente no Sul do Brasil (VARGAS et al., 2005), competindo com as culturas pelos recursos do meio e, conseqüentemente, reduzindo a produtividade. No Brasil o primeiro caso de azevém resistente a herbicidas foi relatado em 2003, onde foram identificados biótipos resistentes ao glifosato em lavouras de culturas anuais e em pomares. Em 2010 foi documentado o primeiro caso de azevém resistente a ALS e em 2017 foi realizado o primeiro relato de resistência múltipla de azevém aos inibidores da EPSPs e ALS (HEAP, 2017).

O glifosato é um herbicida que atua inibindo a enzima EPSPs, impedindo a biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, necessários para a síntese de proteínas, ocasionando o aumento do ácido chiquímico, esse relacionado com o declínio de produtos intermediários da fixação de carbono e a redução da fotossíntese (DUKE; POWLES, 2008).

A determinação dos níveis de ácido chiquímico é uma das estratégias para avaliar o mecanismo de resistência ao glifosato sendo uma alternativa rápida e eficiente (NOL et al., 2012). Uma das respostas da aplicação de glifosato é o acúmulo de ácido chiquímico nos tecidos das plantas e esse acúmulo normalmente é maior em

biótipos suscetíveis em comparação com os biótipos resistentes da mesma espécie. Em biótipos de *Conyza bonariensis*, observou-se acúmulo diferencial de ácido chiquímico em que o biótipo suscetível acumulou 360% mais ácido chiquímico, em comparação com o biótipo resistente ao glifosato (CARDINALI et al., 2015). Porém como ambos acumularam ácido chiquímico o mecanismo de resistência nestas plantas não é devido a insensibilidade total da EPSPs ao glifosato.

Os herbicidas inibidores da ALS agem inibindo a enzima acetolactato sintase, também conhecida como acetohidroxiácido sintase (AHAS), interrompendo a síntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (VARGAS et al., 2009). A identificação do mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores da ALS em plantas pode ser determinada pela atividade da enzima ALS, através do acúmulo de acetoína na presença e ausência da molécula herbicida inibidora da enzima, em que apenas plantas resistentes acumulam acetoína (GERWICK; MIRELES; EILERS, 1993). Entretanto, a maior parte dos estudos demonstra não haver grandes mudanças na afinidade da enzima pelo substrato em plantas resistentes (EBERLEIN et al., 1997; PRESTON et al., 2006; ASHIGH; TARDIF, 2007; CECHIN et al., 2017).

A resistência causada por incremento de metabolização de herbicidas pode ser estudada utilizando-se inibidores específicos do cyt-P450. A aplicação prévia de inibidores de metabolização pode reduzir parcial ou totalmente a expressão de enzimas detoxificantes e, por consequência, reduzir o fator de resistência dos biótipos analisados (LETOUZE; GASQUEZ, 2003; MATZENBACHER, 2012). A metabolização de herbicidas pode ocorrer pela ação do complexo de cyt-P450 monooxigenase ou S-transferase de glutationa, cujas plantas resistentes adquirem a capacidade de desintoxicar o herbicida mais rapidamente do que as suscetíveis (ROSO e VIDAL, 2010). Não obstante, biótipos de *Eleusine indica* não apresentam metabolismo do glifosato, mediante a aplicação prévia do inibidor do complexo cyt-P450 malathion (ULGUIM et al., 2017).

O mecanismo de resistência das plantas daninhas aos herbicidas é importante e determina o nível em que resistência é expressa no campo (POWLES e YU, 2010). Dessa forma, as hipóteses desse trabalho foram que o biótipo suscetível apresenta maior acúmulo de ácido chiquímico comparado aos biótipos resistentes, quando submetidos à aplicação de glifosato, a atividade da enzima ALS é alterada pela resistência ao iodosulfurom-metílico em biótipos de azevém e os biótipos de azevém

não apresentam alteração na metabolização dos herbicidas glifosato, iodosulfurometílico e piroxsulam. Sendo assim, objetivou-se com esse trabalho verificar o mecanismo de resistência através do acúmulo de ácido chiquímico em resposta a aplicação de glifosato; da atividade da enzima ALS em biótipo resistente ao iodosulfurometílico e, da resposta dos biótipos mediante a aplicação de glifosato, iodosulfurometílico e piroxsulam após tratamento com inibidor de metabolismo da cyt-P450 monooxigenase.

### **3.2 Material e métodos**

Para este estudo foram realizados três experimentos que são apresentados a seguir. A produção dos afilhos e as condições de aplicação do herbicida glifosato, iodosulfurometílico e piroxsulam foram realizadas de modo idêntico ao descrito no Capítulo I.

#### **3.2.1 Bioensaio de quantificação in vivo de ácido chiquímico**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao CEHERB/FAEM/UFPel em delineamento experimental de blocos completamente casualizados, com oito repetições. Os tratamentos foram arranjados em esquema trifatorial 2 x 9 x 3, onde o fator A foi constituído de dois biótipos de azevém: suscetível (Susc) e resistente (110); B nove doses de glifosato: 0; 180; 260; 720; 1440; 2880; 5760 e 11520g e.a. ha<sup>-1</sup>; e, C épocas de avaliação: 24, 48 e 96 horas após o tratamento (HAT).

A extração do ácido chiquímico foi realizada de acordo com Singh e Shaner (1998), com modificações feitas por Perez-Jones et al. (2007). Para esta avaliação foi coletada a quarta folha completamente expandida a partir do ápice. O ácido chiquímico foi quantificado em espectrofotômetro (Ultrospec 2000 UV/Visível – Pharmacia Biotech), medindo-se no comprimento de onda de 380nm (CROMARTIE; POLGE, 2000), e a concentração (mg ml<sup>-1</sup>) de solução determinada a partir de curva padrão com diferentes concentrações conhecidas de ácido chiquímico, diluídas em HCl (0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200mg ml<sup>-1</sup>).

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade, pelo teste de Shapiro-Wilk e, posteriormente, submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,05$ ). No caso

de significância, procedeu-se com a análise de regressão para os fatores épocas de coleta do material vegetal e doses de glifosato, e para o fator biótipos, procedeu-se a comparação da dose que proporciona 50% de acúmulo de ácido chiquímico ( $I_{50}$ ).

Aos dados obtidos foram ajustados o modelo de regressão sigmoidal do tipo logístico proposto por Seefeldt; Jensen; Fuerst, (1995), conforme equação:

$$y = a / [1 + (x / x_0)^b]$$

onde:  $y$  = acúmulo de ácido chiquímico;  $x$  = épocas de avaliação ou dose do herbicida; e  $a$ ,  $x_0$  e  $b$  = parâmetros da equação, sendo que  $a$  é a diferença entre os pontos máximo e mínimo da curva,  $x_0$  é a dose que proporciona 50% de resposta da variável e  $b$  é a declividade da curva.

Os resultados para  $I_{50}$  foram obtidos pelo cálculo aritmético do valor necessário para promover 50% da resposta, de acordo com os parâmetros gerados nas equações das curvas calculadas no Software SigmaPlot versão 12.5. A partir dos valores de  $I_{50}$ , obteve-se o FR. Para utilização do FR, foi necessário verificar o intervalo de confiança ( $p \leq 0,05$ ) do biótipo suscetível em relação ao resistente. A não sobreposição do intervalo de confiança do biótipo suscetível, em relação ao resistente, indicou haver diferença no acúmulo de ácido chiquímico entre os biótipos.

### **3.2.2 Determinação *in vitro* da atividade da enzima acetolactato sintase (ALS)**

O bioensaio *in vitro* foi realizado no laboratório de plantas daninhas da Embrapa Trigo em Passo Fundo-RS, seguindo a metodologia proposta por Gerwick, Mireles e Eilers (1993) com algumas modificações. O delineamento experimental foi completamente casualizado, com três repetições. O experimento foi realizado em tubos de ensaio, sendo os tratamentos arranjados em esquema fatorial no qual o fator A foi composto da solução enzimática dos diferentes biótipos Susc e 110 onde cada tubo recebeu 600 $\mu$ L desta solução (enzima) e, o fator B foi composto de diferentes concentrações do herbicida iodosulfurom-metílico: 0; 0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 10; 50; 100 e 500 $\mu$ M, sendo acrescidos de 100 $\mu$ L da solução herbicida por tubo de ensaio. Cada tubo recebeu ainda 300 $\mu$ L do tampão de reação fosfato 80 $\mu$ M, pH=7,0, contendo 20mM de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), 200mM de piruvato, 2mM de tiamina pirofosfato (TPP) e 20 $\mu$ M de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) totalizando 1000 $\mu$ L (volume final da reação). O bioensaio conteve dois tratamentos padrão sem herbicida: o primeiro denominado 0 (zero) e o segundo com 100% (cem) de atividade da enzima



ALS, sendo que o primeiro recebeu 50 $\mu$ L de solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 3M no início do bioensaio para impedir a atividade da enzima e, o segundo, considerado o tratamento padrão, correspondendo à testemunha sem inibidor, foi adicionado 100 $\mu$ L de água milli-Q. Os valores de absorvância desse tratamento foram descontados dos valores das leituras dos demais tratamentos com herbicida ou inibidor enzimático.

Após o preparo da reação nos tubos de ensaio, foi iniciado o primeiro período de incubação, por 60 min a 30°C. A reação foi interrompida com adição de 50 $\mu$ L de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M em cada tubo de ensaio, exceto no controle zero em que a reação já havia sido interrompida inicialmente. A segunda incubação, por 15 min a 60°C, foi realizada para a formação da acetoína, a partir da reação do ácido sulfúrico com o acetolactato, formado durante a primeira reação.

Para a formação do complexo colorido, foram adicionados 1000 $\mu$ L de solução de creatina a 0,5% p/v e 1000 $\mu$ L de 1-naphtol a 5% p/v, preparado em hidróxido de sódio (NaOH) 2,5M no momento do uso. A reação foi novamente incubada por 15 min a 60°C, para o desenvolvimento da cor. Os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e a absorvância lida em espectrofotômetro a 530nm. Os valores referentes à atividade da enzima ALS foram apresentados por quantidade de acetoína produzida ( $\mu$ mol min<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>), determinado pela curva padrão.

A determinação da curva padrão de acetoína foi realizada em tubos de ensaio com três repetições. Cada tubo contve 1000 $\mu$ L de solução de acetoína nas concentrações de 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 e 400 $\mu$ M. Para a formação do complexo colorido foi adicionado em cada tubo 1000 $\mu$ L de solução de creatina 0,5% p/v e 1000 $\mu$ L de 1-naphtol 5% p/v, preparado em hidróxido de sódio (NaOH) 2,5M no momento do uso. Após o preparo da reação, a mistura foi incubada por 15 min a 60°C, para o desenvolvimento da cor. Os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e a absorvância lida em espectrofotômetro a 530nm.

Adicionalmente, foram calculados os parâmetros cinéticos K<sub>M</sub> e V<sub>máx</sub> que informam a afinidade da enzima com o substrato. Para a obtenção do K<sub>M</sub> e do V<sub>máx</sub>, foi realizado um ensaio com dez diferentes concentrações do substrato (0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 e 100mM) em todos os biótipos (Susc e 110). Essas concentrações do substrato foram obtidas através da mistura do tampão de reação fosfato 80 $\mu$ M, pH 7,0, com a solução original de piruvato a 100mM. O primeiro foi composto por 20mM

de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), 2mM de tiamina pirofosfato (TPP) e 20 $\mu$ M de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e, a solução padrão foi composta por 100mL do tampão de reação com 100mM de piruvato.

Os valores de  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram determinados a partir da equação de Michaelis Menten ( $p \leq 0,05$ ) (NELSON; COX, 2006), conforme segue, utilizando o software SigmaPlot 12.5 (SIGMAPLOT, 2013).

$$y = V_{m\acute{a}x} * X / K_M + X$$

onde:  $y$  = atividade da enzima ALS ( $\mu$ mol  $min^{-1}$   $mL^{-1}$ );  $V_{m\acute{a}x}$  = velocidade máxima de reação;  $x$  = concentração do substrato (piruvato) e,  $K_M$  = concentração de substrato (piruvato) que fornece velocidade inicial igual à metade da velocidade máxima de reação.

Os valores de absorbância foram corrigidos subtraindo-se o valor do controle zero. A partir deles, foi calculado o  $I_{50}$ , que representa a quantidade do inibidor necessária para inibir 50% da atividade da enzima, utilizando o modelo logístico de regressão não linear (SEEFELDT; JENSEN; FUERST, 1995), conforme descrito abaixo, utilizando o software SigmaPlot 12.5 (SIGMAPLOT, 2013).

$$y = a / [1 + (x / x_{I50})]^b$$

onde:  $y$  = atividade da enzima ALS (%);  $a$  = assíntota de máxima;  $x$  = dose do herbicida iodosulfurom-metílico ( $\mu$ M);  $x_{I50}$  = dose do herbicida iodosulfurom-metílico sódio ( $\mu$ M) correspondente a 50% da inibição da enzima ALS e  $b$  = declividade da curva.

### 3.2.3 Metabolização de glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam

O experimento foi conduzido em casa de vegetação utilizando delineamento experimental de blocos completamente casualizados com quatro repetições. Os tratamentos foram arranados em esquema fatorial onde o fator A foi composto pelos biótipos de azevém (Susc e 110); e, o fator B avaliou os inibidores do cyt-P450 monooxigenase malathion e butóxido de piperonila (PBO), isolados ou antecedendo o herbicida glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam; glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam isolados; e a testemunha sem aplicação.

Os herbicidas glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam foram aplicados nas doses de 2160g e.a.  $ha^{-1}$ , 3,5g i.a.  $ha^{-1}$  e 18g i.a.  $ha^{-1}$ , respectivamente. Aplicou-se os inibidores de metabolização malathion, na dose de 1000g i.a.  $ha^{-1}$  (YU et al., 2009) e PBO, na dose de 2100g i.a.  $ha^{-1}$ .

Foi avaliado o controle aos 28 DAT, sendo esta avaliação realizada utilizando-se escala percentual, onde zero (0%) representou ausência de injúrias e cem (100%) a morte das plantas SBCPD (1995). Os dados foram analisados quanto à normalidade, pelo teste de Shapiro Wilk, com posterior análise da variância ( $p \leq 0,05$ ). Quando foi observada significância estatística, realizou-se o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para os fatores biótipos e inibidores.

### 3.3 Resultados e discussão

A apresentação dos resultados e discussão de cada experimento estão descritos abaixo, adotando-se a sequência dos materiais e métodos

#### 3.3.1 Bioensaio de quantificação *in vivo* de ácido chiquímico

A análise de variância evidenciou interação entre todos os fatores avaliados para a variável acúmulo de ácido chiquímico, havendo ajuste dos dados à equação de regressão sigmoideal. Os valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) variaram de 0,88 a 0,97 demonstrando ajuste satisfatório dos dados ao modelo (Figura 7). A diferença de acúmulo de ácido chiquímico foi significativa a em todos os períodos de coleta avaliados ( $p < 0,05$ ), sendo que o maior acúmulo foi de  $31,89 \text{ mg mL}^{-1}$  na dose de  $11520 \text{ g e.a ha}^{-1}$  (Susc) e o menor acúmulo foi de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  na dose de  $34 \text{ g e.a ha}^{-1}$  as 96 horas após o tratamento (HAT) para o biótipo suscetível (Figura 9).

Na avaliação das 24 HAT o biótipo Susc acumulou mais que o dobro de ácido chiquímico que o biótipo 110 resultando num FR de 2,26 (Figura 7, tabela 6). Em trabalho realizado por Alarcón-Reverte et al. (2013), houve acúmulo de aproximadamente duas vezes mais ácido chiquímico em plantas suscetíveis de *Echinochloa colona* em comparação a população resistente às 24 HAT com glifosato. Já, Ulguim et al. (2017), avaliando biótipos de *Eleusine indica* com resistência de nível baixo ao glifosato obtiveram um FR de 4,01.

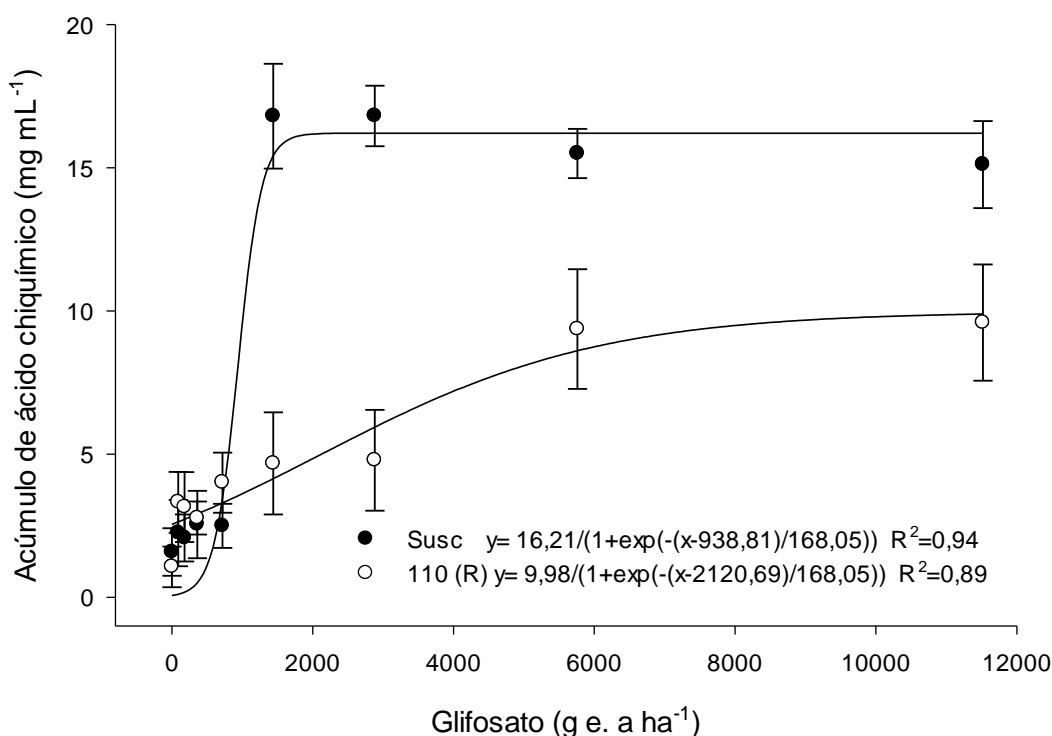


Figura 7 - Acúmulo de ácido chiquímico ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) suscetível (Susc) e resistente (110), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida glifosato, avaliado as 24 horas após o tratamento (HAT), FAEM/UFPEI, Capão do Leão/RS, 2017. Os pontos representam os valores médios das repetições e as barras verticais os intervalos de confiança ( $p \leq 0,05$ ).

Às 48 HAT verificou-se a maior diferença no acúmulo de ácido chiquímico, onde a dose glifosato necessária para acúmulo de 50% ( $I_{50}$ ) de ácido chiquímico no biótipo Susc foi de  $238,7 \text{ g e.a. ha}^{-1}$ , enquanto que no biótipo 110 foram necessárias  $2511 \text{ e.a ha}^{-1}$  resultando em FR de 10,52 (Figura 8, tabela 6). Em estudo realizado com biótipos de azevém resistentes ao glifosato encontraram FR de 6,2 as 48 HAT (VARGAS et al., 2016). Diferenças no acúmulo de ácido chiquímico após o tratamento com glifosato podem ocorrer devido a diferenças na sensibilidade no local alvo ou quando o herbicida não acumula no local de destino de ambos os biótipos em quantidades iguais (PEREZ-JONES et al., 2007; POWLES; PRESTON, 2006).

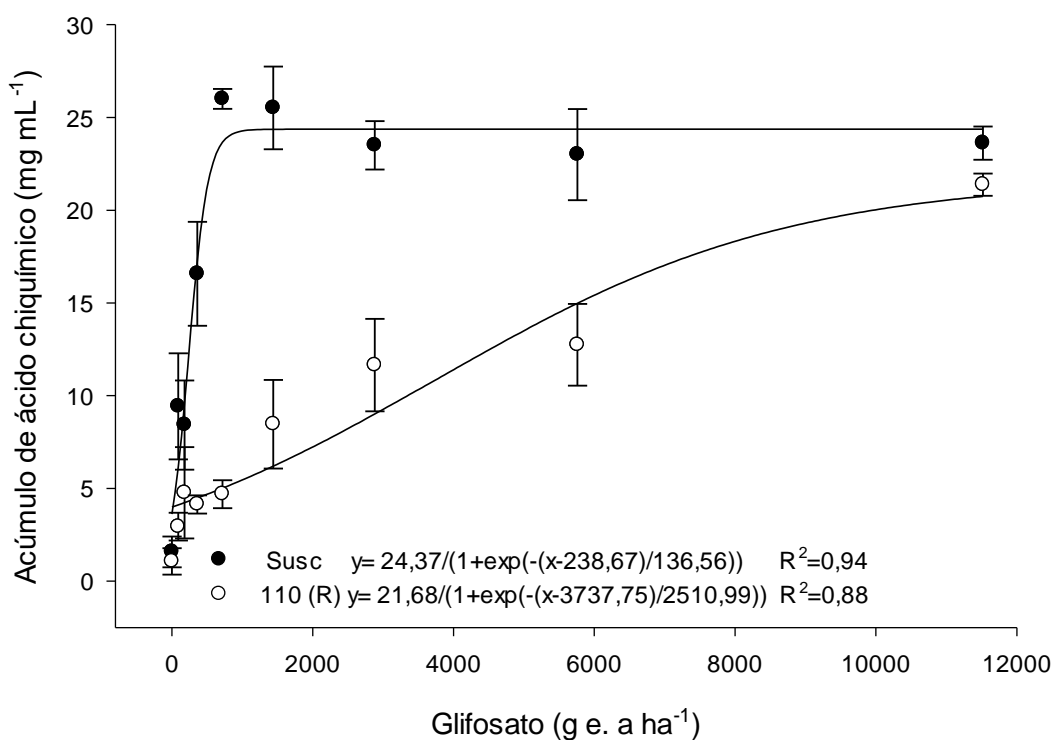


Figura 8 - Acúmulo de ácido chiquímico ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) suscetível (Susc) e resistente (110), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida glifosato, avaliado as 48 horas após o tratamento (HAT) FAEM/UFPEl, Capão do Leão/RS, 2017. Os pontos representam os valores médios das repetições e as barras verticais os intervalos de confiança ( $p \leq 0,05$ ).

Às 96 HAT verificou-se que a partir de  $3000 \text{ g e. a ha}^{-1}$  ocorreu estabilização da curva do ácido chiquímico para o biótipo Susc em torno de  $30 \text{ mg mL}^{-1}$  de ácido chiquímico o que corresponde também ao maior acúmulo durante o período de avaliação (Figura 9). Já, para o biótipo 110 a estabilização começou a ocorrer com o dobro da dose, ou seja,  $6000 \text{ g e. a ha}^{-1}$  de glifosato e o acúmulo máximo foi 33,33% menor, correspondendo a  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  na dose de  $12000 \text{ g e. a ha}^{-1}$ . Também houve redução na  $I_{50}$ , porém o acúmulo de ácido chiquímico no biótipo Susc foi 4,51 vezes maior do que no biótipo 110 (Tabela 6). Em estudo com biótipos de *Lolium rigidum* resistentes ao glifosato no sul da Espanha, verificaram-se valores de acúmulo de ácido chiquímico do biótipo suscetível até 7 vezes superior ao biótipo resistente as 96 HAT (FERNÁNDEZ-MORENO; BASTIDA; DE PRADO, 2017). Já, biótipos de *Eleusine indica* resistentes ao glifosato no Estado do Mississippi- EUA, acumularam 5 a 8 vezes mais ácido chiquímico em comparação ao biótipo suscetível (MOLIN; WRIGHT; NANDULA, 2013).

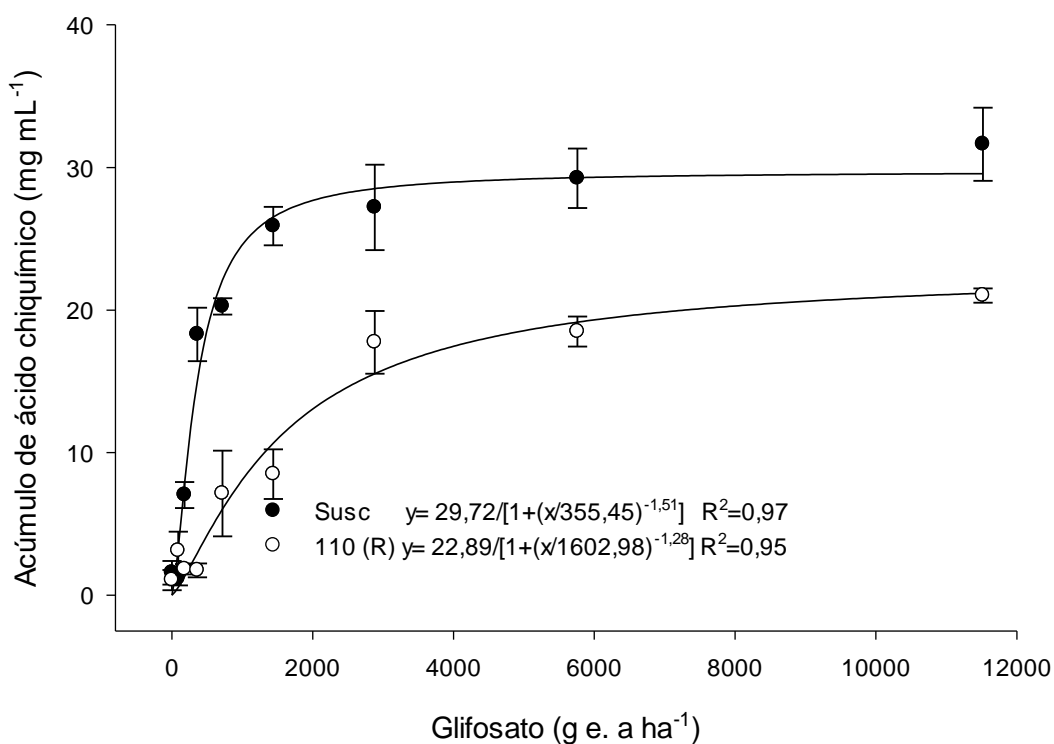


Figura 9 - Acúmulo de ácido chiquímico ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) suscetível (Susc) e resistente (110), em função da aplicação de diferentes doses do herbicida glifosato, avaliado as 96 horas após o tratamento (HAT), FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017. Os pontos representam os valores médios das repetições e as barras verticais os intervalos de confiança ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 6 - Dose necessária para acúmulo de 50% de ácido chiquímico ( $I_{50}$ ), com intervalos de confiança (IC) e fator de resistência dos biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) suscetível (Susc) e resistente (110), em resposta a aplicação de diferentes doses do herbicida glifosato, avaliado as 24, 48 e 96 horas após o tratamento (HAT). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017.

$I_{50}$			
24 HAT			
Biótipo	g i.a ha <sup>-1</sup>	95% IC	Fator de resistência <sup>1</sup>
Susc	938,8	780-1096	-
110	2121,091	1744-2497	2,26
48 HAT			
Susc	238,7	203-273	-
110	2511	2217-2904	10,52
96 HAT			
Susc	355	300-409	-
110	1602	1276-1927	4,51

<sup>1</sup>Fator de resistência ao herbicida glifosato dos biótipos de azevém, obtido da divisão do  $I_{50}$  do biótipo resistente (110) em relação ao biótipo suscetível ao herbicida (Susc).

Como ambos os biótipos acumularam ácido chiquímico, se entende que o glifosato chegou ao local de destino e inibiu a enzima EPSPs das populações, ainda que em diferentes níveis, como foi também verificado em biótipos de buva (CARDINALI et al., 2015), azevém (VARGAS et al., 2016) e capim pé-de-galinha (ULGUIM et al., 2017) resistentes a glifosato. Dessa forma pode-se inferir que o mecanismo de resistência nestas plantas não foi devido a insensibilidade da EPSPs ao glifosato nem transporte reduzido. Se houvesse uma insensibilidade de EPSPs ao glifosato nas plantas resistentes, não haveria acúmulo de ácido chiquímico (CARDINALI et al., 2015).

As diferentes respostas ao glifosato entre os biótipos referem-se a um mecanismo de resistência ou mecanismos que atenuam os efeitos tóxicos resultantes do mecanismo de ação do glifosato em plantas (ALARCÓN-REVERTE et al., 2013). Esses mecanismos podem ou não ser resultado da mudança no sítio de ação do herbicida (POWLES e PRESTON, 2006; POWLES e YU, 2010; MOLIN; WRIGHT; NANDULA, 2013).

O mecanismo de resistência devido ao local alterado de ação pode ocorrer devido à troca de um ou mais aminoácidos na enzima alvo, o que dificulta o acoplamento correto do herbicida, ou mesmo devido à superexpressão da enzima alvo (POWLES e YU, 2010). Quando o mecanismo de resistência não está relacionado com a mudança no local de ação, um ou mais fatores agem para impedir que o herbicida chegue ao ponto de inibição em quantidades letais, impedindo sua inibição completa (POWLES e YU, 2010). Esses mecanismos envolvem absorção e/ou translocação reduzida de herbicidas, aumento das taxas de metabolismo ou sequestro de herbicidas em organelas celulares metabolicamente inativas (FENG et al., 2004; PEREZ-JONES et al., 2007; DINELLI et al., 2008; SHANER, 2009; POWLES e YU, 2010; GE et al., 2012).

Feng et al. (2004) sugerem que a resistência provavelmente deve-se a uma distribuição celular de glifosato alterada, que impede o fluxo de herbicidas no floema e a importação dentro dos plastídios, resultando assim na translocação global reduzida do herbicida na planta. Shaner (2009) propôs diferentes tipos de exclusão celular ou compartimentação celular como mecanismos de resistência ao glifosato como a existência de transportadores que bombeiam o glifosato para o vacúolo que poderiam prevenir o dano celular como mecanismo de exclusão celular ou o herbicida

poderia ser bombeado das células para o apoplasto ou a absorção ativa do glifosato poderia ser inibida por uma modificação do transportador de fosfato ativo. Em estudo com biótipos de azevém resistentes, provenientes do Chile e do Brasil, Ge et al. (2012) encontraram resultados que demonstram que ocorre sequestro de glifosato no vacúolo e também aumento da retenção de glifosato no tecido da região tratada, reduzindo assim a quantidade disponível para o acesso ao floema e a translocação para os tecidos meristemáticos da planta. Esses mesmos autores apontam que a extensão do sequestro de glifosato no vacúolo correlaciona-se qualitativamente com o nível de resistência ao glifosato desempenhando papel importante sendo possivelmente o principal mecanismo de contribuição para a resistência em azevém.

Desse modo o mecanismo de resistência do biótipo 110 não é devido a insensibilidade da EPSPs ao glifosato e as diferenças entre os biótipos podem ser devido a atuação de diferentes mecanismos. A identificação dos processos e mecanismos que estão envolvidos na resistência das plantas daninhas aos herbicidas e como eles ocorrem é fundamental para entendê-la e manejá-la da melhor forma possível. Novos estudos como por exemplo carbono marcado para avaliar a translocação do herbicida nas plantas e sequenciamento do gene visando identificar possíveis mutações, são necessários para elucidar o mecanismo de resistência desse biótipo ao glifosato.

### **3.3.2 Determinação *in vitro* da atividade da enzima acetolactato sintase (ALS)**

A atividade da enzima ALS para os biótipos 110 e Susc foi obtida através da quantidade de acetoína produzida e, em função do teor de proteína. Obteve-se os valores para cada biótipo através das curvas padrão de acetoína (Figura 10) e de proteína (Figura 11).

A dosagem de proteínas permite a quantificação exata da concentração de proteínas numa determinada amostra vegetal; sendo uma etapa fundamental devido à necessidade de se utilizar uma concentração conhecida nas etapas subsequentes e tem como objetivo realizar a dosagem de proteínas totais de diferentes amostras vegetais.



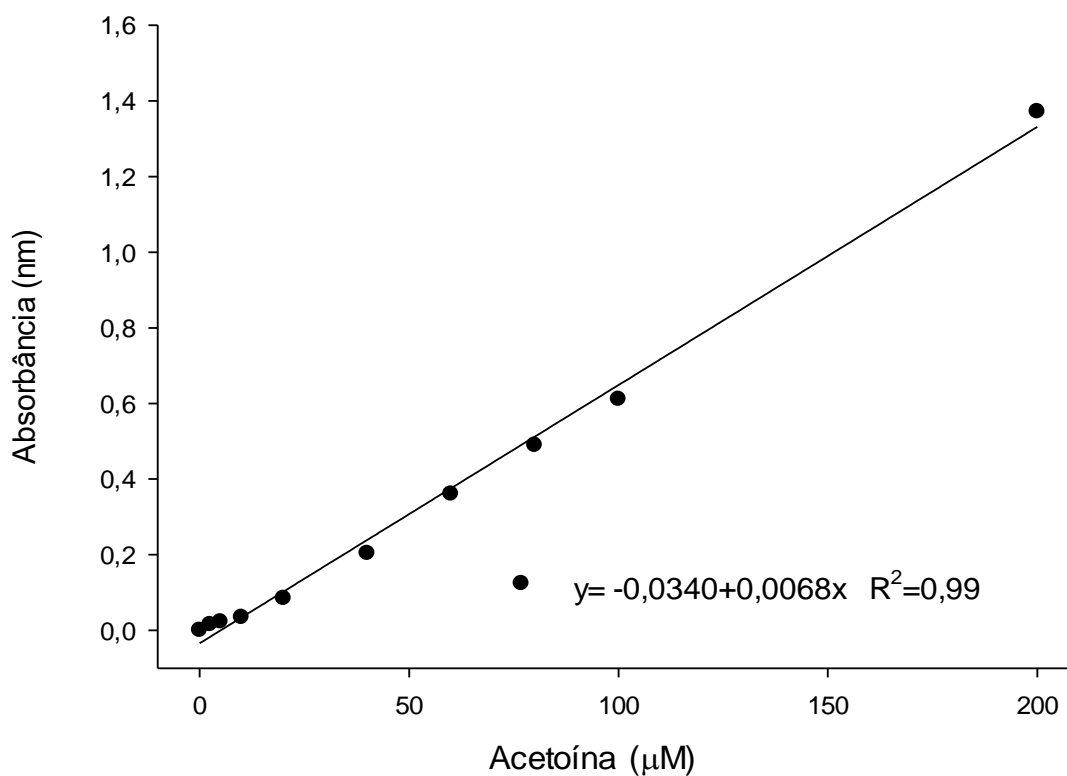


Figura 10-Curva padrão de acetoina utilizada para a determinação da atividade da enzima ALS para os biótipos suscetível (Susc) e resistente (110). Embrapa Trigo, Passo Fundo/RS, 2017 Os pontos representam os valores médios das repetições ( $p \leq 0,05$ ).

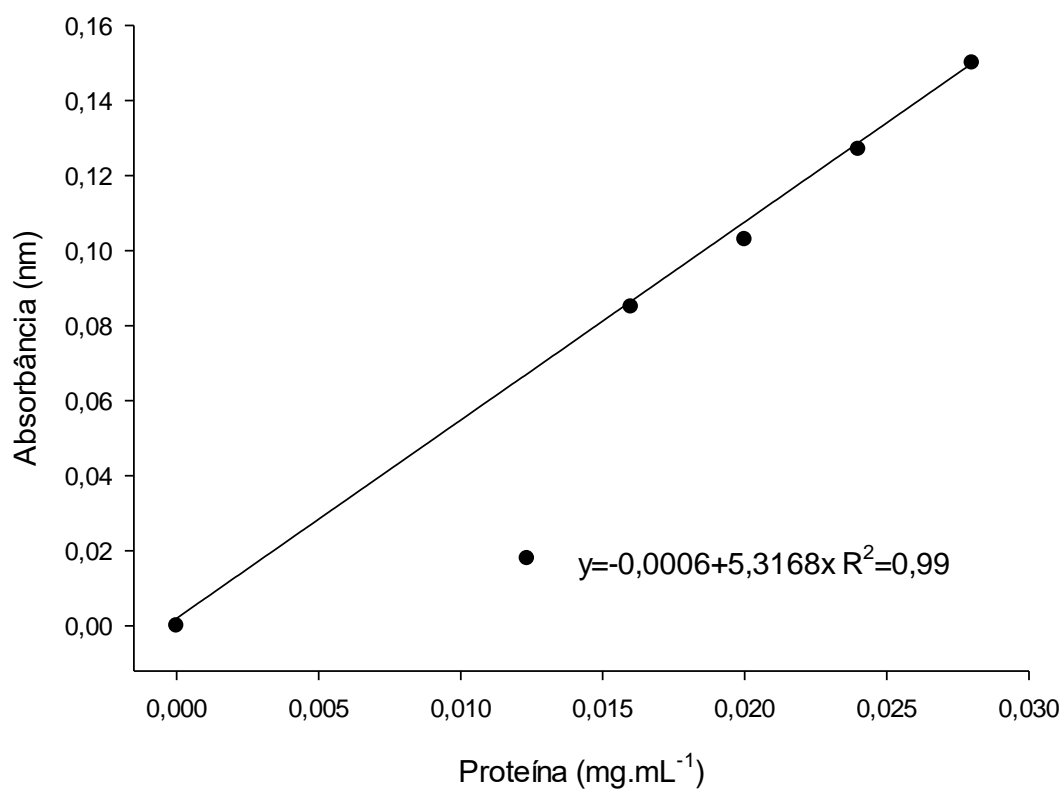


Figura 11-Curva padrão de proteína utilizada para a determinação da atividade da enzima ALS para os biótipos suscetível (Susc) e resistente (110). Embrapa Trigo, Passo Fundo/RS, 2017 Os pontos representam os valores médios das repetições ( $p \leq 0,05$ ).

Para os valores de concentração de piruvato que proporciona metade da velocidade máxima da reação ou a afinidade enzimática para o substrato ( $K_M$ ) dos biótipos avaliados foram obtidos valores de 18,65 e 12,43mM para o biótipo Susc e 110, respectivamente (Figura 12). Quanto menor a  $K_M$  maior a afinidade da enzima com o substrato, dessa forma, observou-se que o biótipo 110 teve maior afinidade para se ligar com o substrato. Com relação a velocidade máxima da reação ( $V_{max}$ ) foram observados valores de 0,543 $\mu$ mol.min<sup>-1</sup> para o biótipo Susc e 0,769 $\mu$ mol.min<sup>-1</sup> para o biótipo 110 (Figura 12). Portanto, a eficiência da conversão de piruvato, foi maior no biótipo 110, uma vez que seu  $V_{max}$  foi maior que o do biótipo Susc. Resultados similares foram encontrados por Xavier et al. 2013 avaliando a atividade da ALS em biótipos de *Euphorbia heterophylla* resistente a herbicidas inibidores da ALS e Protox em que o biótipo resistente apresentou menor  $K_M$  e maior  $V_{max}$ .

Em estudos realizados por Vargas (2000), Ashigh & Tardif (2007) e Dal Magro et al. (2010) os biótipos resistentes aos herbicidas inibidores de ALS não apresentaram alterações nos parâmetros cinéticos ( $K_M$  e  $V_{max}$ ) em comparação com biótipos suscetíveis indicando que a resistência não afetou a ligação ao piruvato.

Em geral os herbicidas inibidores da ALS podem se ligar ao mesmo local ou a diferentes locais da enzima, podendo ou não ser competitivos com o substrato (DEWAELE et al., 1997) e especificamente no caso de sulfonilureias e triazolopirimidas, é exibida inibição competitiva e não competitiva (inibição de tipo misto) (SUBRAMANIAN e GERWICK, 1989; DURNER et al., 1991). A resistência associada à alteração no local de ação do herbicida é variável podendo ou não representar mudanças na funcionalidade da enzima, que pode resultar produto da biossíntese inalterado, insuficiente ou excessivo (VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009b). O tipo de mutação na enzima também altera a sua magnitude, isto é, certos aminoácidos alterados podem causar impactos adversos na afinidade do substrato com a enzima e assim, alterar a funcionalidade da mesma (YU; HAN; VILA-AIUB, 2010).

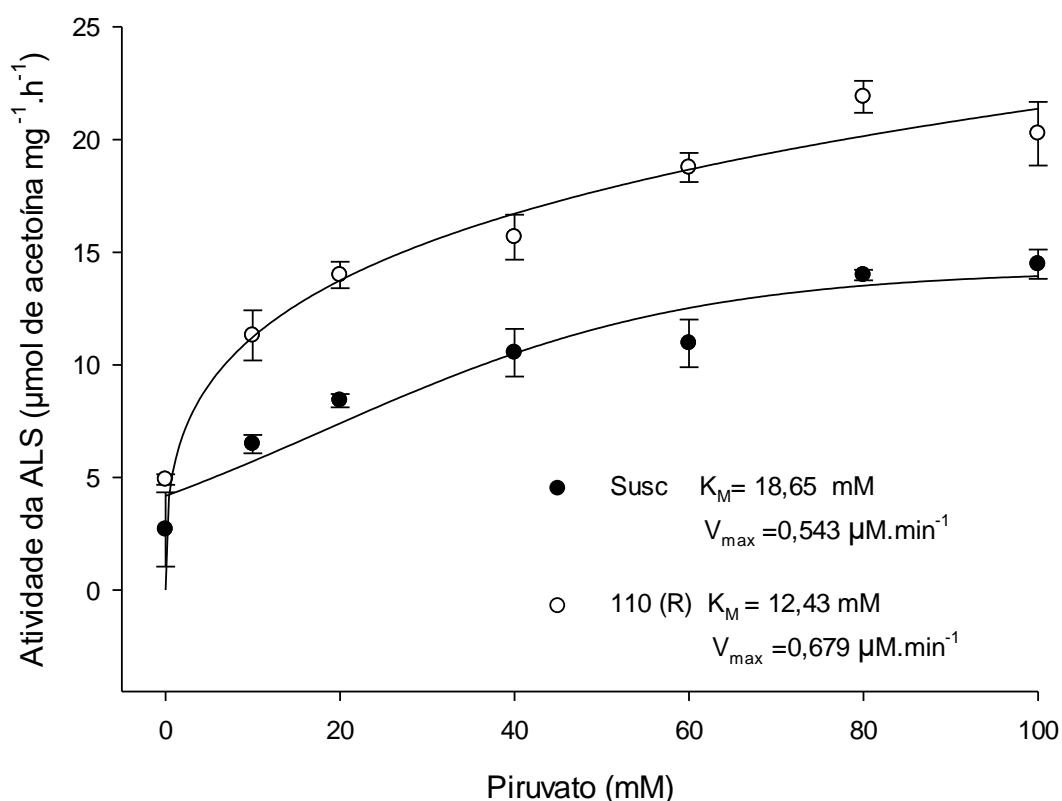


Figura 12 -Atividade da enzima acetolactato sintase (ALS) de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) resistente (110) e suscetível (Susc) ao herbicida iodosulfurom-metílico sódico expressa em produção de acetoina em função de diferentes concentrações de substrato (piruvato). Embrapa Trigo, Passo Fundo/RS 2017. Os pontos representam os valores médios das repetições e as barras verticais os intervalos de confiança ( $p \leq 0,05$ ).

Para atividade da enzima ALS na presença do herbicida iodosulfuom-metílico houve interação entre os fatores estudados. Os resultados do ensaio *in vitro* com a enzima ALS demonstraram que é necessária uma dose de  $0,904 \mu\text{M}$  do herbicida iodosulfuom-metílico para inibir 50% da atividade da enzima ( $I_{50}$ ) no biótipo Susc (Figura 13). Para o biótipo 110 as doses utilizadas não causaram inibição de 50% da atividade da enzima. Testes preliminares (dados não apresentados) foram realizados com doses até  $1000 \mu\text{M}$  do herbicida e mesmo assim os valores de inibição foram inferiores a 50% (em torno de 40%). Isto significa que a enzima ALS do biótipo 110 foi menos inibida, sugerindo que houve alteração no local de ligação do herbicida com a proteína e que a inibição pode ser alostérica (VARGAS e ROMAN, 2006). Dentre as consequências da inibição alostérica está a mudança na conformação e na atividade da enzima dificultando a ligação do herbicida nesse sítio e consequentemente tornando a enzima menos sensível aos herbicidas.

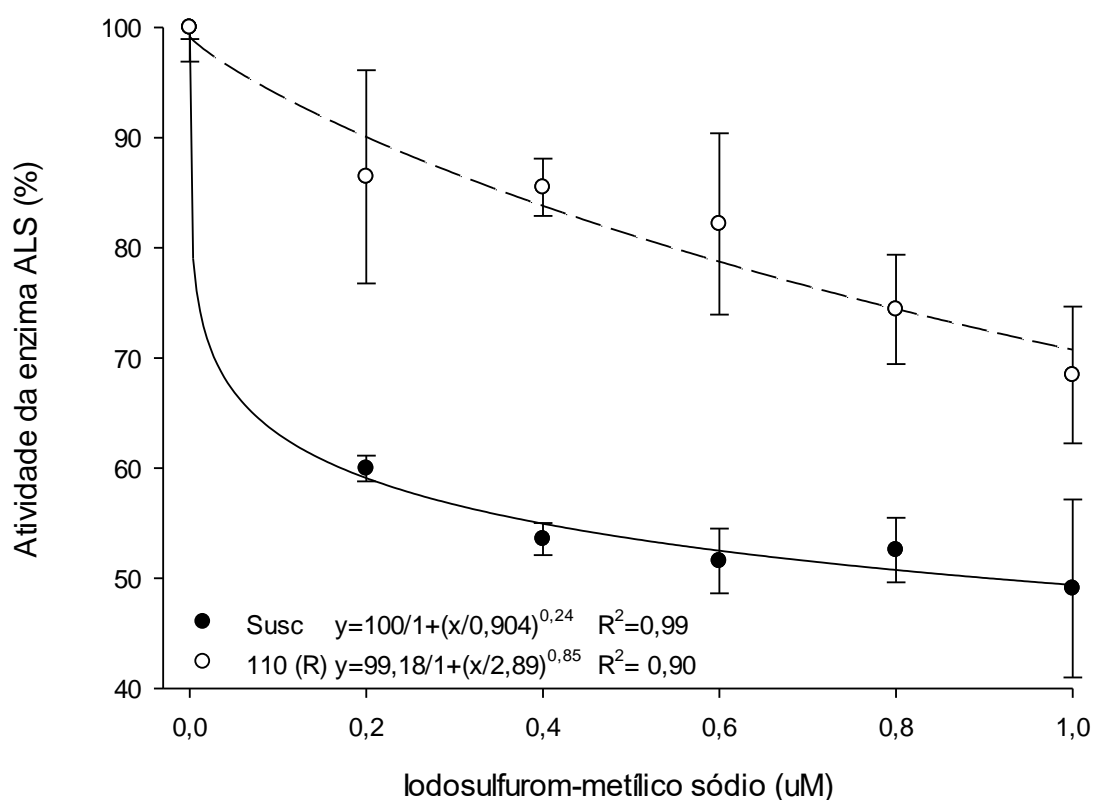


Figura 13- Inibição *in vitro* da atividade da enzima ALS em biótipo de azevém (*Lolium multiflorum*) resistente (110) e suscetível (Susc) pelo herbicida iodosulfurom-metilico sódio. Embrapa Trigo, Passo Fundo/RS 2017. Os pontos representam os valores médios das repetições e as barras verticais os intervalos de confiança ( $p \leq 0,05$ ).

De acordo com os resultados observados confirmou-se a sensibilidade alterada da enzima ALS em biótipos resistentes, indicando que uma possível mutação pode estar causando alterações no sítio regulatório, o que pode inibir ou reduzir a afinidade dos inibidores da ALS e ocasionar a resistência a herbicidas no biótipo 110. Mudanças na conformação enzimática, em consequência da alteração da sequência de aminoácidos no local de mutação podem explicar a maior afinidade da enzima ALS no biótipo 110. Dessa forma, se descarta a hipótese de provável resistência pelo mecanismo de superexpressão da enzima alvo. Esse resultado corrobora com os resultados das curvas dose-resposta do Capítulo I, onde o aumento da dose não resultou em maior controle desses biótipos. No caso de se realizar o controle químico, o mesmo deverá ser realizado mediante a utilização de herbicidas com diferentes mecanismos de ação.

### 3.3.3 Estudo do metabolismo dos herbicidas glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam

De acordo com o teste de Shapiro-Wilk não foi necessária a transformação dos dados. Observou-se interação entre os fatores na época avaliada (28 DAT). A aplicação do herbicida glifosato isolado ou com a aplicação antecipada de PBO ou malathion resultou em 100 % de controle do biótipo Susc, enquanto para o biótipo 110 o controle ficou abaixo de 65% nos 3 tratamentos citados (Tabela 7). Ainda, a aplicação dos inibidores do cyt-P450 malathion e butóxido de piperolina (PBO) isolados não apresentou diferença entre os biótipos analisados. Resultados semelhantes foram observados em biótipos de *Eleusine indica* com baixo nível de resistência ao glifosato (ULGUIM et al., 2017) e em biótipos de azevém resistentes ao glifosato (VARGAS et al., 2016), onde não foram constatadas diferenças no controle entre a aplicação prévia dos inibidores do cyt-P450 e a aplicação isolada de glifosato. Atualmente não se tem relato de nenhum caso de resistência ao glifosato através do metabolismo por ação do complexo cyt-P450.

Para os tratamentos com iodosulfurom-metílico e piroxsulam a aplicação antecipada de malathion ou PBO também não diferiu dos resultados dos herbicidas isolados, não havendo incremento no controle com a utilização dos inibidores (Tabela 7). Biótipos de *Lolium rigidum* apresentaram aumento no percentual de controle quando foi utilizado inibidor do cyt P450 antes do herbicida chlorsulfuron em comparação com a aplicação isolada do herbicida (YU; POWLES, 2014). Em outro estudo, a aplicação prévia de malathion ou PBO ao herbicida imazethapir, causou redução no fator de resistência de três dos seis biótipos de capim-arroz, na avaliação de controle aos 12 e 14 DAT (MATZENBACHER, 2012).

Em experimento realizado com biótipos de *Raphanus sativus* resistentes a ALS não houve resposta diferencial dos biótipos quando submetidos a aplicação prévia de malathion e PBO (CECHIN et al., 2017). Outro trabalho efetuado com biótipos resistentes a herbicidas ALS de *Poa annua* observou-se aumento no controle do herbicida bispyribac-sódio quando o malathion foi utilizado (BROSNAN et al., 2015). Porém, para outros herbicidas inibidores da ALS esses resultados não foram observados, o que demonstra que o mecanismo de resistência envolvido não é devido ao metabolismo diferencial por cyt P450 monooxigenase (BROSNAN et al., 2015).

Tabela 7 - Controle (%) aos e 28 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT) biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) suscetível (Susc) e resistente (110), submetidos à aplicação de glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam isolados ou antecedido em 30 min da aplicação dos inibidores do cyt-P450 monooxigenase (PBO e malathion) e testemunha sem aplicação. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2017.

Tratamentos	Biótipos			
	Susc		110	
Testemunha	0	A b	0	A c
PBO	0	A b	0	A c
Malathion	0	A b	0	A c
Glifosato	100	A a	61,75	B a
Glifosato + PBO	100	A a	63,5	B a
Glifosato + Malathion	100	A a	61,5	B a
Iodosulfurom-metílico	99,25	A a	0	B c
Iodosulfurom-metílico + PBO	95	A a	2	B bc
Iodosulfurom-metílico+ Malathion	100	A a	3,5	B bc
Piroxsulam	98,5	A a	4,5	B bc
Piroxsulam +PBO	99,5	A a	3	B bc
Piroxsulam + Malathion	100	A a	6,25	B b
CV (%)	5,49			

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas (maiúsculas) e nas colunas (minúsculas), não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

As enzimas do complexo cyt P450 formam uma grande família de genes de monooxigenase que desempenham papel importante no metabolismo de várias substâncias, atuando na oxidação de xenobióticos e promovendo a desintoxicação do organismo, normalmente por hidroxilação ou desalquilação (ZHU et al., 2008).

O malathion é um inseticida organofosforado que libera enxofre inibindo a apoproteína P450 (WERCK-REICHHART; HEHN; DIDIERJEAN, 2000). Esse inseticida é frequentemente utilizado para identificar a ocorrência de metabolização como mecanismo que confere resistência a plantas daninhas (CHRISTOPHER; PRESTON; POWLES, 1994; PRESTON et al., 1996, HONGCHUN et al., 2013; BROSNAN et al., 2015). Já, o PBO atua no metabolismo oxidativo do grupo metileno do cyt P450, resultando na formação de carbeno e de complexo praticamente irreversível com o heme ferro de enzimas P450 (FEYEREISEN, 1999).

Em síntese o biótipo 110 não apresentou resposta metabólica diferencial ao herbicida glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam mediante a aplicação prévia de malathion e PBO, excluindo assim a possibilidade de o mecanismo de resistência ser devido a metabolização dos herbicidas.

O entendimento dos fatores que evitam a seleção de biótipos resistentes, bem como aqueles que favorecem o desenvolvimento da resistência são importantes

(PRESTON et al., 2009), pois a partir destes conhecimentos é possível realizar a escolha do manejo adequado dessa planta daninha, com adoção de rotação e sucessão de culturas e rotação e/ou associação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação, a fim de evitar o surgimento e a disseminação de biótipos resistentes em lavouras do Sul do Brasil.

### **3.4 Conclusões**

O mecanismo de resistência ao glifosato do biótipo 110 não é devido a insensibilidade da EPSPs ao glifosato.

A resistência do biótipo 110 é resultado da insensibilidade da enzima ALS ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio.

O biótipo 110 não apresenta metabolismo do glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam pelo complexo cyt P450, no que se refere à inibição por malathion ou butóxido de piperonila (PBO).

## **4 CAPÍTULO III - Valor adaptativo e habilidade competitiva de biótipos de *Lolium multiflorum* L. resistentes aos herbicidas glifosato (EPSPs), iodosulfurom-metílico e piroxsulam (ALS)**

### **4.1 Introdução**

O azevém (*Lolium multiflorum* L.) é 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). Essas características fazem do azevém importante forrageira de inverno para regiões de clima temperado do Sul do Brasil. Além disso, a ressemeadura natural do azevém permite sua permanência no banco de sementes do solo e fluxos de emergência heterogêneos, tornando oneroso o manejo dessa espécie quando presente em áreas cultivadas com cereais de inverno (TIRONI et al., 2014).

A redução do impacto negativo do azevém sobre a produtividade e qualidade dos grãos colhidos é indispensável, onde o controle químico com herbicidas inibidores da enzima 5-enolpiruvil-chiquimato 3-fosfato sintase (EPSPs) e acetolactato sintase (ALS) é considerada a principal ferramenta de manejo. O controle químico alia praticidade, eficiência e baixo custo quando comparado a outros métodos de controle (CÔRREA et al., 2014). Todavia, biótipos de plantas daninhas resistentes a herbicidas tem evoluído em resposta ao uso exagerado de um mesmo princípio ativo ou mecanismo de ação, o que torna o controle mais oneroso e difícil, especialmente na cultura do trigo onde as opções herbicidas são limitadas (VARGAS et al., 2009).

Mediante a evolução de populações de difícil controle químico, o valor adaptativo de alelos resistentes pode ser acompanhado da existência de custos de adaptação, sendo que estes efeitos pleiotrópicos podem ser negativos ou positivos em dado ambiente dependendo do alelo relacionado (VILA-AIUB; NEVE; POWLES,



2009b; DÉLYE et al., 2013). É possível fazer a comparação entre os biótipos de azevém, através do valor adaptativo ou “*fitness*”. Estudos para a compreensão do comportamento dos componentes de crescimento e sobrevivência da espécie, em função do aproveitamento dos recursos de crescimento em determinado nicho ecológico são relevantes.

A habilidade competitiva de uma planta refere-se à capacidade de ela suprimir o crescimento de outra ou à sua habilidade em manter relativamente inalterado seu crescimento na presença de competidores, evitando desse modo ser suprimida (GOLDBERG & LANDA, 1991). Os estudos de competitividade entre biótipos suscetível e resistente, permitem desenvolver estratégias manejo, pois ajudam a definir as características que conferem maior habilidade competitiva aos biótipos de interesse. Biótipos com maior rapidez no incremento de área foliar, estatura, massa seca, cobertura do solo e interceptação de luz, podem apresentar maior habilidade competitiva (RADOSEVICH; HOLT; GHERSA 2007) auxiliando na supressão das plantas daninhas e/ou biótipos resistentes.

Alterações no valor adaptativo foram estudados para a espécie de *L. rigidum*, em que o mecanismo de resistência foi a metabolização pelas enzimas P450, causando reduzida taxa de crescimento relativa (TCR), taxa de assimilação líquida (TAL) e menor habilidade competitiva (VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009a). Outro exemplo são os biótipos de azevém suscetíveis ao herbicida glifosato que acumularam mais matéria seca, tiveram maior produção de sementes e apresentaram maior capacidade competitiva que biótipos resistentes (VARGAS et al., 2005; FERREIRA et al., 2008). Porém, biótipos de azevém resistentes ao iodosulfurometílico não apresentaram diferença significativa relacionadas ao valor adaptativo em comparação ao biótipo suscetível (MARIANI et al., 2016). Desta forma, fica evidente que as plantas têm a capacidade de se adaptar frente às mudanças e modificar a alocação dos recursos (VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009b), produzindo diferentes respostas de acordo com o herbicida utilizado e a espécie estudada.

Estudos que avaliem as diferentes respostas dos biótipos com relação ao seu valor adaptativo e habilidade competitiva são fundamentais para entender a dinâmica de crescimento, competição por recursos do meio e capacidade de perpetuação da espécie, tornando-se essenciais na tomada de decisões com relação ao manejo de populações de plantas daninhas resistentes a herbicidas, visando mitigar os efeitos

da resistência e sua disseminação. Este trabalho teve por hipótese que o biótipo resistente apresenta valor adaptativo e habilidade competitiva igual ao do biótipo suscetível. O objetivo deste trabalho foi identificar e comparar o desenvolvimento fenológico, estimar o valor adaptativo e avaliar a habilidade competitiva de biótipos de azevém resistente e suscetível ao herbicida glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam.

## **4.2 Material e métodos**

Os experimentos abaixo foram conduzidos em casa de vegetação do Centro de Estudos em Herbologia (Ceherb), da Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão-RS. Os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental inteiramente ao acaso, com quatro repetições, durante o período de abril a outubro de 2017. Cada unidade experimental (vasos plásticos) foi preenchida com Argissolo Vermelho-Amarelo de textura franco arenosa, pertencente à unidade de mapeamento de Pelotas-RS (EMBRAPA, 2013), sendo o pH e a fertilidade previamente corrigidos conforme análise do solo (TEDESCO et al., 2004). Os biótipos de azevém utilizados foram o suscetível (Susc) e resistente (110).

### **4.2.1 Desenvolvimento fenológico dos biótipos**

A avaliação do desenvolvimento fenológico foi realizada utilizando as plantas do experimento de valor adaptativo, onde cada planta constituiu uma unidade experimental. Foram avaliadas oito plantas diferentes de cada biótipo, semanalmente, em que, cada estágio fenológico pré-determinado foi considerado quando 50% ou mais das plantas apresentavam as mesmas características fenotípicas.

A verificação dos estádios fenológicos dos biótipos de azevém foi realizada nos meses de abril a setembro. Foi utilizada a escala fenológica proposta por Hess et al. (1997) (Tabela 8). Em ambos biótipos, foi contabilizado o número de dias necessários após a emergência (DAE) para que cada biótipo atingisse os estádios fenológicos descritos.

Tabela 8 - Estádios fenológicos que foram utilizados para contabilizar os dias após a emergência (DAE) que cada biótipo de azevém (*Lolium multiflorum*) necessitou para atingi-los. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2017.

Estádio fenológico	Código BBCH <sup>1</sup>
Emergência	09
Primeira folha sai do coleóptilo	10
Início do perfilhamento	21
Fim do perfilhamento	29
Elongação (1° nó visível)	31
Fim da elongação	39
Bainha da folha bandeira inicia elongação	42
Bainha da folha bandeira abre-se	48
Início do espigamento	51
Fim do espigamento	59
Início do florescimento	61
Fim do florescimento	69
Grãos Aquoso	71
Grão Leitoso	76
Grão pastoso	86
Maturação plena	89

<sup>1</sup>Escala fenológica abordada por Hess et al. (1997).

#### 4.2.2 Valor adaptativo

No experimento de valor adaptativo, cada unidade experimental foi composta por uma planta de azevém disposta no centro de cada vaso de polietileno com diâmetro de 23 cm e capacidade para 6 dm<sup>3</sup>. Os biótipos foram semeados no mês de abril, em bandejas de polietileno até a emergência e após as plantas foram transplantadas para os vasos. Os tratamentos foram alocados em esquema fatorial (2 x 8), o fator A consistiu de plantas do biótipo suscetível (Susc) e resistente (110) e o fator B de oito épocas de coleta: 15, 30, 45, 60, 80, 100, 120 e 140 dias após a emergência (DAE).

As variáveis avaliadas, em cada época, foram: número de afilhos (NA), estatura de plantas (EP), área foliar (AF) e massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA). A Determinação da AF foi efetuada com auxílio de medidor de área foliar LI-3100C (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EUA). EP foi verificada com auxílio de régua graduada, medindo o comprimento desde o nível do solo até o ápice da planta, com o limbo foliar distendido. NP através de contagem e MMSPA pelo corte das plantas rente

à superfície do solo sendo submetida a secagem em estufa de circulação forçada de ar, a  $60 \pm 5^\circ\text{C}$  por 72 h, com posterior pesagem do material.

Foram calculadas as seguintes variáveis indiretas: índice de área foliar (IAF), expressa em  $\text{cm}^2$  por  $\text{cm}^2$ , que representa a área foliar total por unidade de área do terreno e indica a superfície disponível para interceptação e absorção de luz, pela equação:  $\text{IAF} = \text{AF} / \text{área do vaso}$ ; razão de área foliar (RAF), em  $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ , representa a relação de AF e MMSPA, demonstrando a área foliar disponível para a fotossíntese, obtida através da equação:  $\text{RAF} = (\text{AF1} + \text{AF2}) / (\text{MSPA1} + \text{MSPA2})$ ; taxa de crescimento absoluto (TCA), em grama por dia, utilizada para mensurar a velocidade média de crescimento ao longo do período de observação, pela equação:  $\text{TCA} = (\text{MMSPA2} - \text{MMSPA1}) / (\text{T1} - \text{T2})$ , em que MMSPA1 e MMSPA2 são a variação da MMSPA em duas amostras consecutivas tomadas nos tempos T1 e T2 (MAGALHÃES, 1979).

Os dados obtidos foram verificados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk), posteriormente submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,05$ ). No caso de significância estatística, realizou-se análise de regressão para o fator épocas de avaliação, para todas as variáveis, ajustando-se os dados à equação de regressão sigmoideal do tipo logístico (SEEFELDT; JENSEN; FUERST, 1995).

$$y = a / [1 + (x / x_0)^b]$$

onde:  $y$  = variável resposta de interesse;  $x$  = número de dias acumulados; e  $a$ ,  $x_0$  e  $b$  = parâmetros estimados da equação, sendo  $a$  = diferença entre os pontos máximo e mínimo da variável;  $x_0$  = número de dias necessários para a ocorrência de 50% de resposta da variável e  $b$  = declividade da curva.

#### 4.2.3 Habilidade competitiva

Para avaliar a habilidade competitiva entre os biótipos de azevém, foi necessário realizar experimento de série aditiva para calcular a população de plantas de azevém por  $\text{m}^2$  com base na capacidade de suporte do ambiente (K) "Lei de produção final constante", em que a massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) por unidade de área ( $\text{g m}^{-2}$ ) torna-se constante e independente da população (RADOSEVICH; HOLT; GHERSA 2007). Para isso, foram utilizados os valores calculados por Mariani et al. 2016b trabalhando com azevém suscetível e resistente a iodosulfurom-metílico. De acordo esses resultados, a população de plantas em que a

MMSPA se tornou constante e independente da população, na média dos biótipos, foi de 1.693 plantas  $m^{-2}$ , equivalente a 48 plantas por vaso<sup>-1</sup>.

A partir dos dados obtidos nas séries aditivas instalou-se o experimento de séries de substituição, nos quais os biótipos (suscetível e resistente) foram mantidos em monocultivo ou associados em proporções variáveis, mas com população final de plantas constante. As combinações utilizadas foram: 100:0 (estande puro do biótipo resistente), 75:25, 50:50, 25:75 e 0:100 (estande puro do biótipo suscetível).

Os biótipos foram previamente semeados em bandejas e aos quatro dias após a emergência as plântulas foram repicadas equidistantes nos vasos. Para facilitar a diferenciação dos biótipos, as plantas do biótipo resistente foram marcadas com fitilho. Aos 50 DAE, foi realizada a coleta dos experimentos e avaliado as variáveis AF, EP, NP e MMSPA de todas as plantas que constituíam cada unidade experimental, conforme metodologia descrita anteriormente.

Para análise das variáveis AF, EP, NP e MMSPA foi utilizado método de análise gráfica para experimentos substitutivos (RADOSEVICH; HOLT; GHERSA, 2007; ROUSH et al., 1989; COUSENS, 1991), que consiste na construção de diagramas com base na produtividade relativa (PR) e produtividade relativa total (PRT), pelas proporções de 0, 25, 50, 75 e 100% da cultura (Susc) e da planta daninha (110). A PR das variáveis avaliadas foi calculada pelo fator de divisão entre a média da associação pela média do monocultivo, acrescentando no cálculo a média por planta de cada biótipo em cada vaso. A PRT foi representada pela soma das produtividades relativas do competidor (110) e da cultura (Susc), nas respectivas proporções de plantas (HOFFMAN; BUHLER, 2002).

A construção dos diagramas da PR e PRT foram baseadas na comparação dos resultados encontrados com uma reta teórica unindo os pontos 0 e 100% para PR, e ligando os pontos 100% para PRT. Se PR for igual à reta teórica, indica ausência de interferência entre os biótipos. Caso PR resultar em linha côncava caracteriza que houve prejuízo no crescimento de um ou de ambos os biótipos e, caso PR formar linha convexa revela que houve benefício no crescimento de um ou de ambos biótipos. A PRT formando linha igual à reta teórica aponta que ocorre competição pelos mesmos recursos; quando PRT for superior a um (linha convexa) revela que não ocorre competição pelos recursos do meio; quando inferior a um (linha côncava), a PRT

indica que ocorre antagonismo, ou seja, o crescimento de ambos biótipos foi prejudicado.

Também foram calculados os índices de competitividade relativa (CR), coeficientes de agrupamento relativo (K) e de competitividade (C) na proporção de 50% de plantas do biótipo suscetível e do biótipo resistente. O CR representa o crescimento comparativo do biótipo R (110) em relação ao biótipo D (Susc); K indica a dominância relativa de um biótipo sobre o outro; e, C indica qual biótipo é mais competitivo (COUSENS, 1991).

O biótipo C se apresentará como mais competitivo que o biótipo D quando  $CR > 1$ ,  $KT > KD$  e  $C > 0$ . Já, o biótipo D é mais competitivo quando  $CR < 1$ ,  $KT < KD$  e  $A < 0$ . As equações destes índices são dadas a seguir, de acordo com Hoffman e Buhler (2002):

$$CR = ((1 - p)/p) (PRR/PRD)$$

$$KR = ((1 - p)/p) (PRR/(1 - PRR))$$

$$KD = ((1 - p)/p) (PRD/(1 - PRD))$$

$$C = (PRR/2p) - (PRD/(2(1 - p)))$$

Para realizar a análise estatística da produtividade relativa, inicialmente, calculou-se a diferença para os valores de PR, ou seja, as diferenças relativas de produtividade (DPR), obtidos nas proporções de 25, 50 e 75% de plantas, em relação aos valores pertencentes às retas hipotéticas nas respectivas proporções. Posteriormente foi realizado o teste “t” a 5% de probabilidade, para verificar as diferenças nos índices DPR, PRT, CR, K e C (ROUSH et al., 1989; HOFFMAN e BUHLER, 2002). Considerou-se, como hipótese de nulidade ( $H_0 = 0$ ) para testar as diferenças de DPR e C; para PRT e CR, que elas fossem iguais a 1 ( $H_0 = 1$ ); e para K, que as médias das diferenças entre  $K_a$  e  $K_b$  fossem nulas [ $H_0 = (K_a - K_b) = 0$ ]. O critério adotado para considerar se as curvas de PR e PRT fossem diferentes das retas teóricas é que, no mínimo em duas proporções, ocorre-se diferença significativa pelo teste “t”. Já, para os índices CR, K e C, a existência de diferença em competitividade quando, no mínimo em dois deles, houvesse diferença significativa pelo teste “t” (BIANCHI; FLECK; LAMEGO, 2006).

Os resultados médios obtidos para as variáveis AF, MS, EP e NP foram avaliados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e, posteriormente, submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,05$ ). Quando constatada significância estatística para AF,

MS, EP e NP, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Dunnett ( $p \leq 0,05$ ), tendo como tratamento padrão o respectivo monocultivo.

### **4.3 Resultados e discussão**

Os resultados e discussão serão apresentados de acordo com a sequencia das atividades apresentadas no material e métodos.

#### **4.3.1 Desenvolvimento fenológico dos biótipos**

Os resultados evidenciaram diferenças na duração dos estádios fenológicos do azevém suscetível (Susc) e com resistência múltipla (110) para os períodos compreendidos entre a emergência e maturidade fisiológica (Figura 14). O ciclo de vida do biótipo resistente foi de 153 dias enquanto que para o biótipo suscetível o ciclo foi de 191 dias (Figura 14). A diferença ocorreu principalmente no estágio de afilhamento. O ciclo mais curto para o azevém resistente pode ser considerado um agravante visto que a espécie apresenta fecundação cruzada e a resistência para herbicidas inibidores da EPSPs e ALS é do tipo nuclear sendo transferida via pólen para as plantas suscetíveis (VARGAS et al., 2007). Dessa forma, essas plantas irão cruzar entre si, antes do florescimento das plantas suscetíveis aumentando a homozigose dos genes que conferem a resistência e ocuparão o banco de sementes mais precocemente, reduzindo a probabilidade da planta ser eliminada antes de completar o ciclo e, contribuindo para a rápida dispersão da população resistente dentro das áreas infestadas e demais áreas adjacentes.

Outra característica importante está relacionada com a velocidade de emergência e ao rápido crescimento inicial de plântulas, tornando-as mais competitivas devido melhor ocupação do espaço e utilização dos recursos do meio (GUSTAFSON et al., 2004). O desenvolvimento mais rápido de plantas proporcionado pela maior capacidade de interceptação da luz, rápida expansão de área foliar e melhor colonização do dossel na camada superior através do alongamento da bainha, pecíolo e entrenós do colmo, resultam em maior habilidade competitiva (MCKENZIE-GOPSILL et al., 2016).

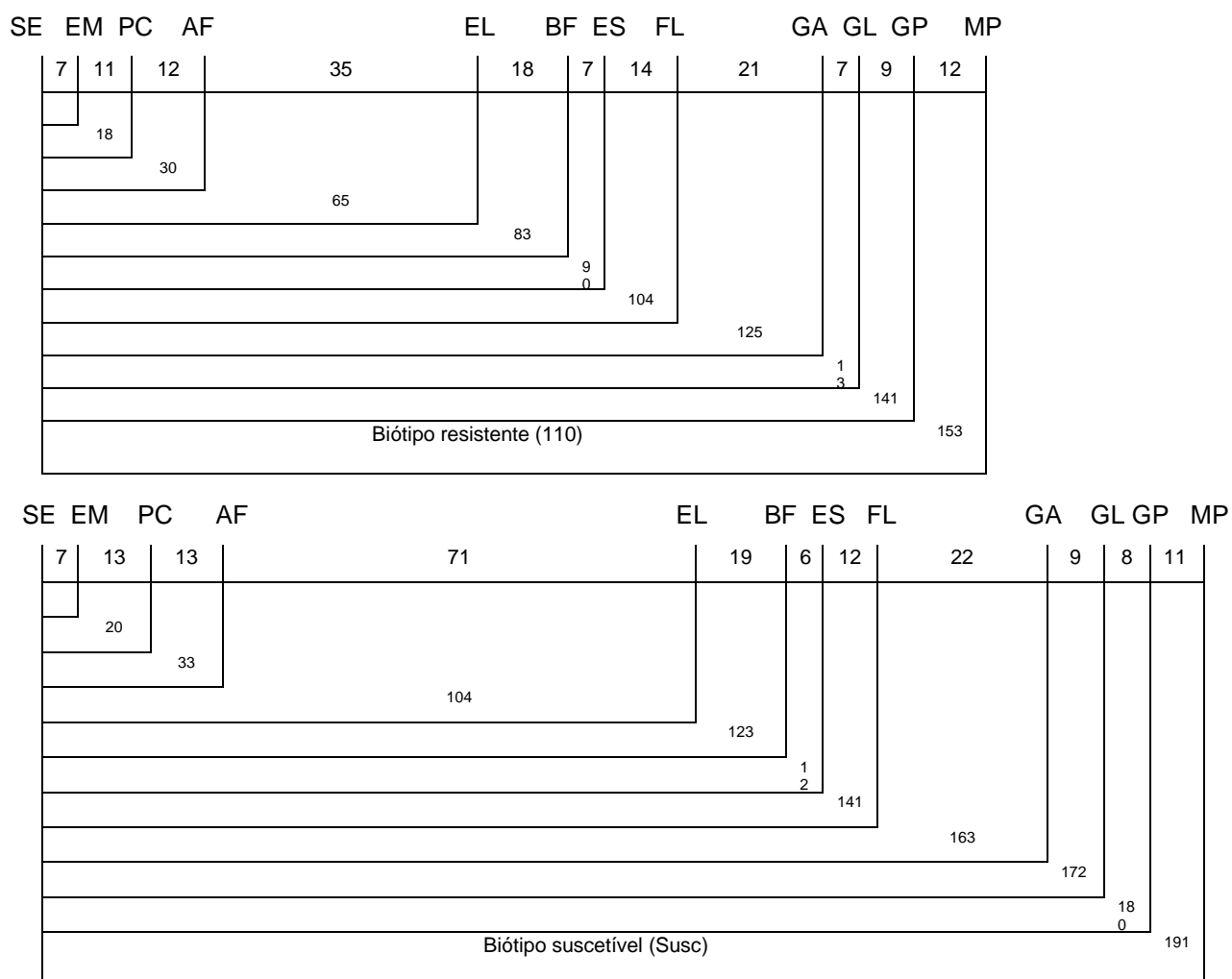


Figura 14- Duração em dias dos estágios fenológicos de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) resistente (110) e suscetível (Susc) com base na escala fenológica adaptada de Bleiholder et al. (1991). FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2017. Semeadura (SE); emergência (EM); primeira folha completa sai do coleóptilo (PC); afilhamento (AF); alongação (EL); bainha da folha bandeira inicia alongação (BF) espigamento (ES); florescimento (FL); grão aquoso (GA); grão Leitoso (GL); grão pastoso (GP); maturação plena (MP).

O ciclo mais curto em populações de plantas daninhas resistentes requer a adoção de diferentes práticas de manejo a fim de minimizar e/ou evitar a dispersão das sementes e, dessa forma, contribuir na redução dos bancos de sementes. Práticas de manejo complementares e em conjunto que incluem a rotação de culturas e a utilização de diferentes herbicidas com mecanismos de ação distintos na pré e pós emergência podem contribuir na redução da germinação e no estabelecimento de plantas resistentes. Outra alternativa como no caso do biótipo 110, que possui ciclo mais curto, é a adoção da integração lavoura-pecuária onde pode-se utilizar do pastejo mais intensivo com maior lotação animal nos primeiros meses de estabelecimento do azevém com o objetivo de reduzir a produção de sementes do



biótipo resistente resultando na gradativa redução das sementes deste biótipo no banco de sementes do solo.

### 4.3.2 Valor adaptativo

De acordo com o teste de Shapiro-Wilk, não foi necessária à transformação dos dados. A análise de variância demonstrou interação entre os fatores biótipos e épocas de avaliação para todas as variáveis, com ajuste ao modelo de regressão do tipo sigmoidal onde os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) variaram entre 0,95 a 0,99 (Figura 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21).

Para a variável NA, verificou-se através do intervalo de confiança, diferença entre os biótipos a partir dos 80 DAE com NA 31% superior para o biótipo suscetível comparado ao resistente na avaliação aos 140 DAE (Figura 15). O maior NA em plantas é considerada uma vantagem competitiva na ocupação do espaço e, conseqüentemente, na supressão no crescimento de plantas vizinhas (TIRONI et al., 2014). Além disso, a ocorrência de ciclo mais longo para o biótipo suscetível corrobora com o maior período para afilhamento evidenciando maior capacidade na alocação de recursos limitados em determinado ambiente (Figura 14).

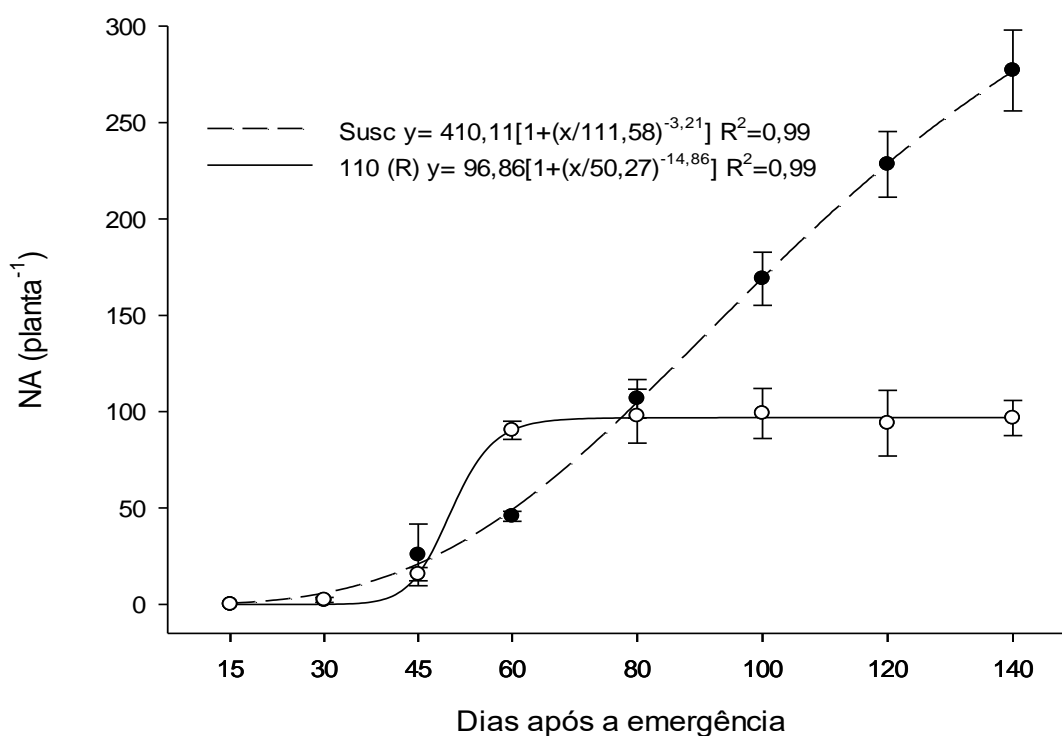


Figura 15 -Número de afilhos (NA) de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) suscetível (Susc) e resistente (110), avaliados dos 15 aos 140 DAE. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017. Os pontos representam os valores médios das repetições de cada biótipo em cada época, e as barras, os intervalos de confiança de cada tratamento.

Para a variável EP, os resultados demonstraram que o biótipo resistente foi 43% superior ao suscetível aos 140 DAE com EP similar entre os biótipos nas avaliações até 60 DAE (Figura 16). A EP é uma característica morfológica importante que interfere na competição por luz (FLECK et al., 2008) devido a capacidade de evitar a sombra, permitindo as plantas maior habilidade competitiva com plantas vizinhas (FLECK et al., 2006). Resultados similares foram verificados em biótipos de azevém resistentes aos herbicidas iodossulfurom-metílico e fluazifop onde foram observados maior EP nas avaliações a partir dos 60 DAE (MARIANI et al., 2016; FRAGA et al., 2013). Além disso, ao avaliar diferentes níveis populacionais em poaceas forrageiras cultivadas puras, foi constatada a existência de relação inversa entre a EP e o número de filhotes devido a partição diferencial do assimilado para filhotes (CALSIANA et al., 2012). O incremento da densidade acarreta em redução no NA e tende a estimular o estiolamento das plantas, favorecendo a captação de luz, pois o mesmo ocorre em resposta a qualidade da luz detectada pelos fotoreceptores da fitocromo que causa mudanças fisiológicas em plantas (FLECK et al., 2006, MCKENZIE-GOPSILL et al., 2016). Assim, o biótipo Susc pode ser prejudicado quando submetido a competição com o biótipo 110, uma vez que este apresentou maior EP.

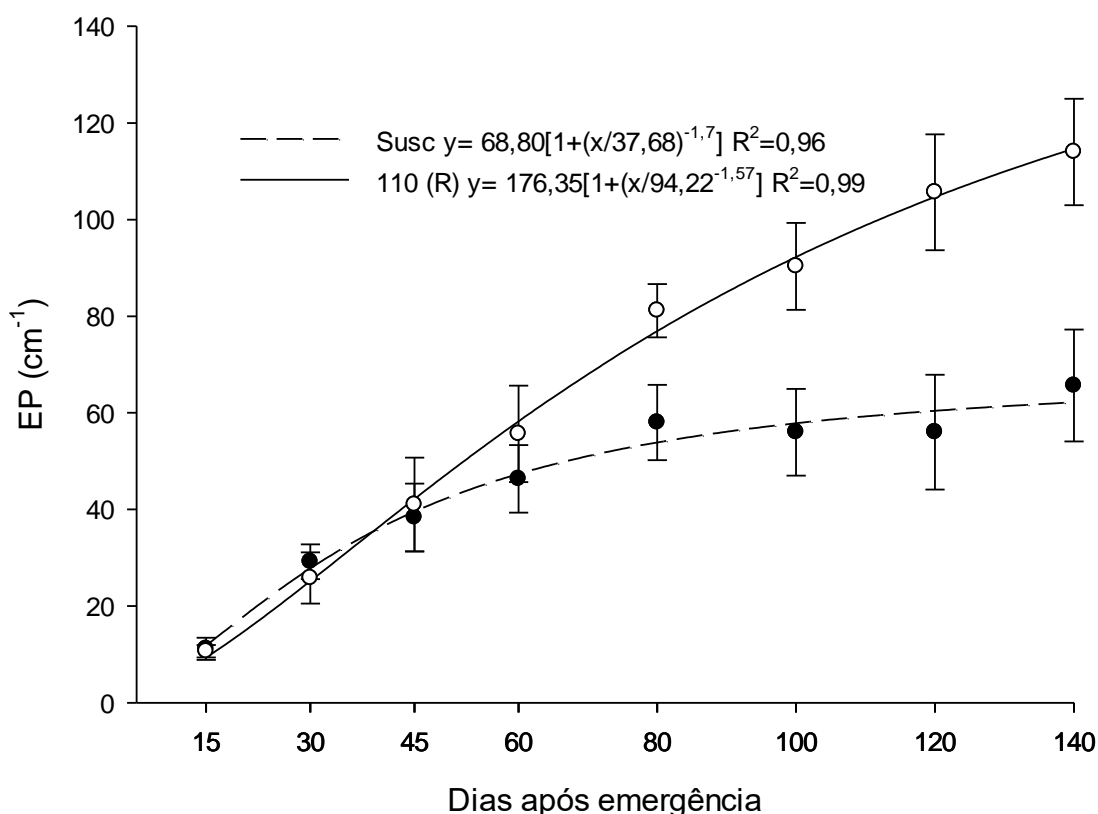


Figura 16- Estatura (EP) de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) suscetível (Susc) e resistente (110), avaliados dos 15 aos 140 DAE. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2017. Os pontos representam os valores médios das repetições de cada biótipo em cada época, e as barras, os intervalos de confiança de cada tratamento.

O comportamento e acúmulo da MMSPA, foi homogêneo até a os 80 DAE (Figura 17). A partir do intervalo de confiança, verifica-se que o biótipo 110 apresentou acúmulo 47% superior ao biótipo Susc aos 140 DAE. O acúmulo de MMSPA depende da relação colmo:folha, sendo que o conteúdo de água nestes órgãos influencia nesta característica (TONETTO et al., 2011) em que o aumento dessa relação incide em maior MMSPA. O maior acúmulo de MMSPA do biótipo 110 já era esperado, pois o mesmo apresentou maior EP, o que, portanto, aumenta sua relação colmo:folha além de que plantas com maior estatura e área foliar apresentam vantagens na interceptação da radiação solar, especialmente na fase inicial do estabelecimento, que favorece o acúmulo e fixação de CO<sub>2</sub> (PONTES et al., 2003) e consequentemente de MMSPA. A habilidade de uma espécie em acumular fitomassa é uma das características que determina sua competitividade (CARVALHO et al., 2005), de forma que, quanto maior for a produção de MMSPA, maior será a redução nos recursos ambientais, o que pode resultar na supressão do crescimento das plantas circundantes (FLECK et al., 2006).

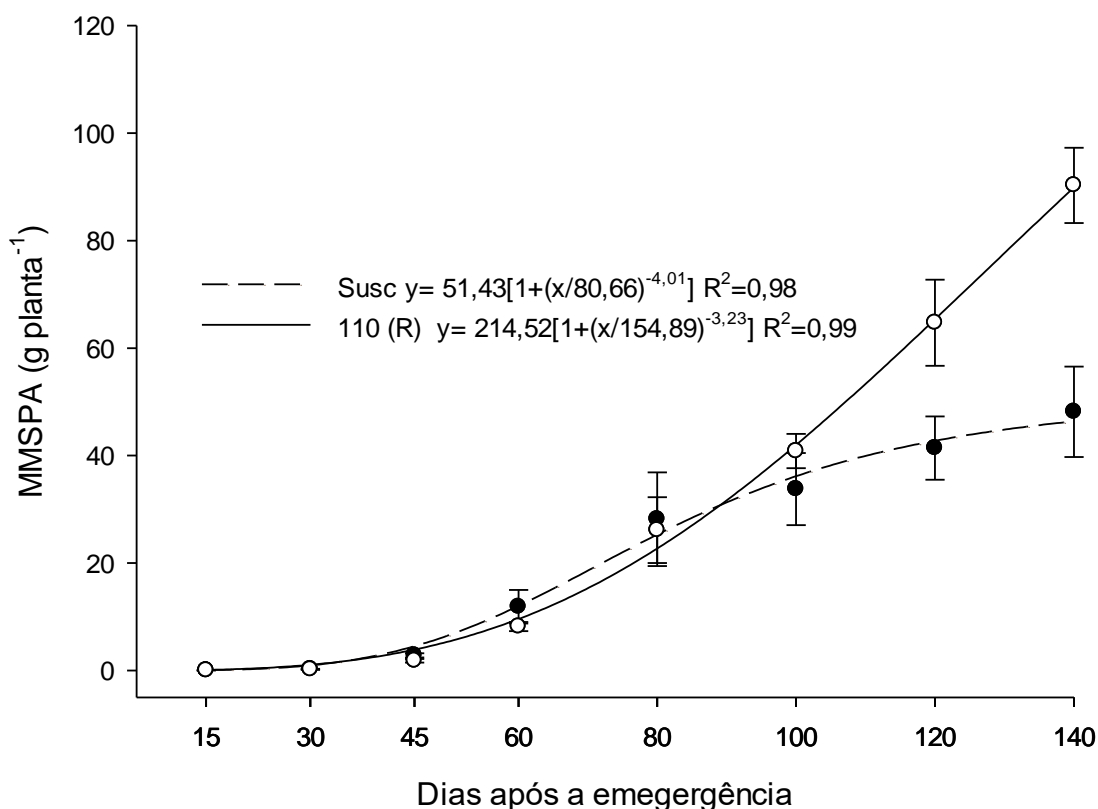


Figura 17- Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) suscetível (Susc) e resistente (110), avaliados dos 15 aos 140 DAE. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2017. Os pontos representam os valores médios das repetições de cada biótipo em cada época, e as barras, os intervalos de confiança de cada tratamento.

Ao avaliar a AF, o incremento inicial foi lento até os 45 DAE, com crescimento exponencial evidenciado nas avaliações dos 45 aos 80 DAE (Figura 18). Durante a fase exponencial de incremento de AF, a maior diferença entre os biótipos ocorreu aos 100 DAE sendo 23% para o biótipo suscetível. Todavia, os valores de AF não diferiram entre si aos 140 DAE devido a sobreposição dos IC. Os resultados sugerem que a relação positiva com o NA evidenciados para o biótipo suscetível está relacionada com a partição de assimilados entre o sistema radicular e as folhas e aos processos dependentes da fotossíntese (MAGALHÃES, 1985).

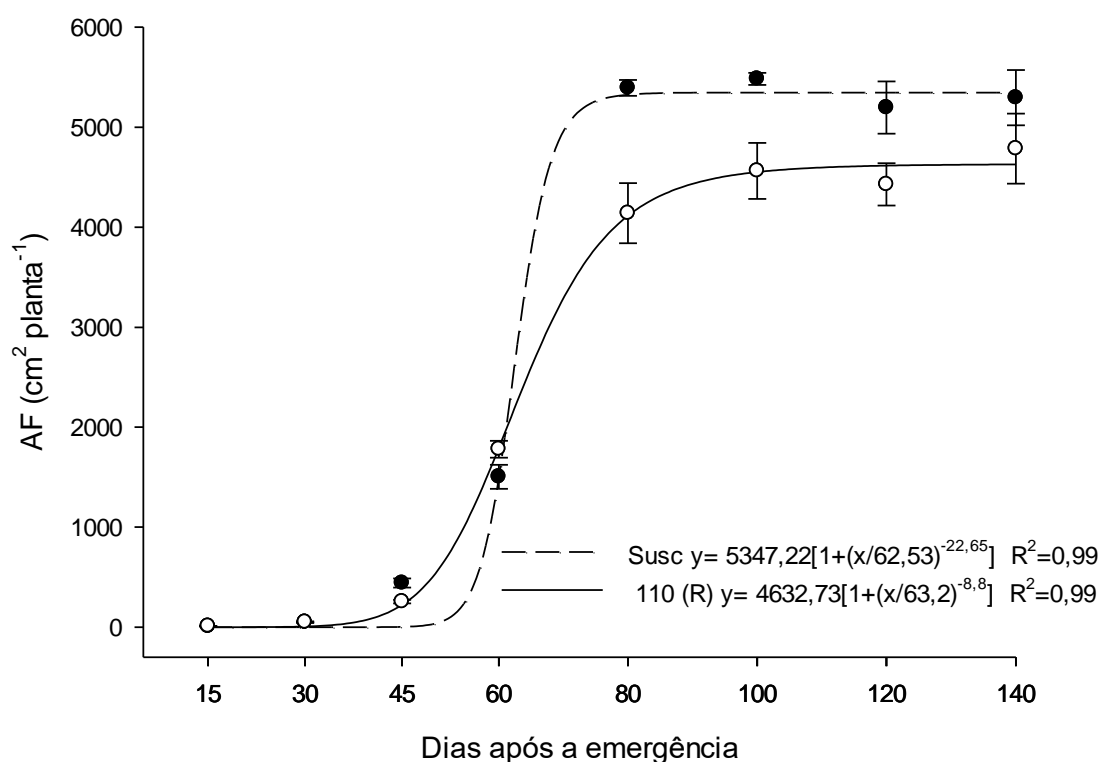


Figura 18 - Área foliar (AF) de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) suscetível (Susc) e resistente (110), avaliados dos 15 aos 140 DAE. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2017. Os pontos representam os valores médios das repetições de cada biótipo em cada época, e as barras, os intervalos de confiança de cada tratamento.

Para IAF o comportamento foi similar a AF, ocorrendo linearização da variável aos 100 DAE que coincide com o início estabilização da EP do biótipo Susc (Figura 19). Ao atingir o tamanho definitivo, a planta entra para a fase de reprodução e senescência, diminuindo o IAF, com menor interceptação da energia luminosa, resultando em decréscimo no acúmulo de matéria seca, com a translocação desta para os órgãos de reservas, e consequente degeneração do sistema fotossintético (PEIXOTO & PEIXOTO, 2004).

Plantas com maior IAF e AF são mais eficientes na fixação de CO<sub>2</sub>, visto que esses valores estão diretamente relacionados com a interceptação de luz e capacidade fotossintética oferecendo vantagens as plantas quando submetidas a competição com outras plantas (FRAGA et al., 2013).

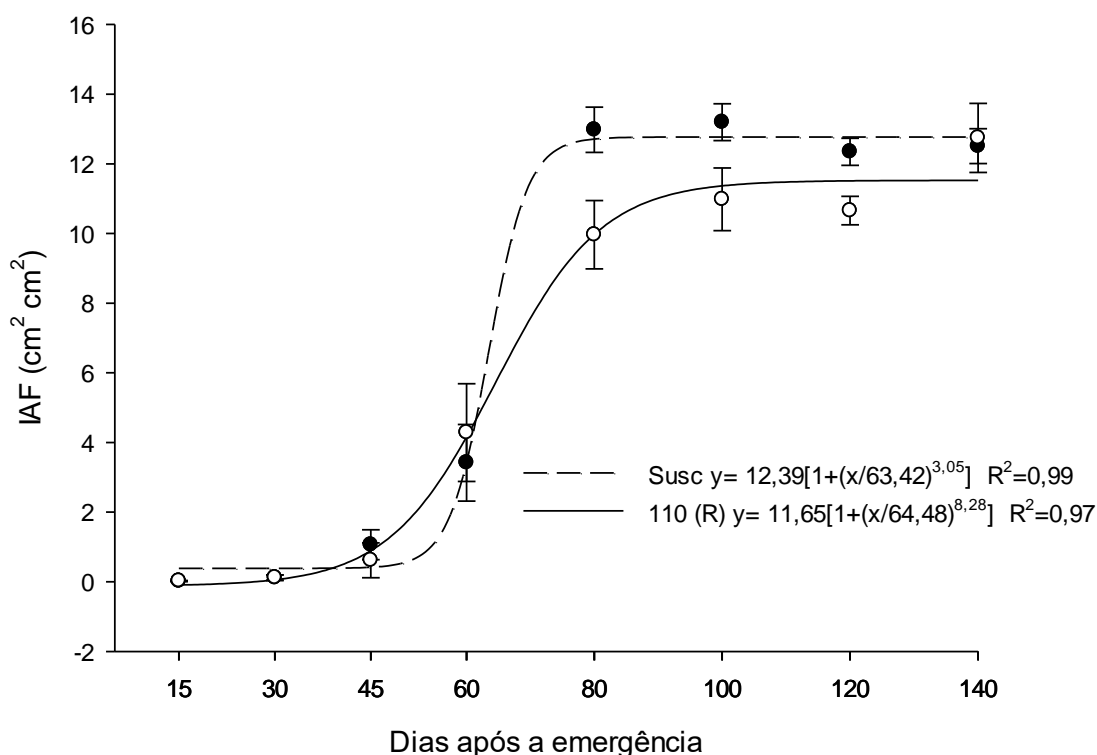


Figura 19- Índice de área foliar (IAF) de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) suscetível (Sus) e resistente (110), avaliados dos 15 aos 140 DAE. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2017. Os pontos representam os valores médios das repetições de cada biótipo em cada época, e as barras, os intervalos de confiança de cada tratamento.

A RAF demonstra a resposta da planta durante o crescimento e desenvolvimento em função a alocação de fotoassimilados para tecidos e estruturas assimilatórias como colmos, raízes e estruturas reprodutivas. Dessa forma, a planta torna-se menos eficiente na conversão de energia em função da redução da superfície fotossintetizante, autossombreamento, bem como, senescência de folhas ao longo do ciclo da planta (URCHEI et al., 2000). Com relação a RAF, houve decréscimo nos valores dos biótipos ao longo do período avaliado (Figura 20). Para o biótipo suscetível, houve aumento da AF em função do maior período de afilhamento enquanto que, no biótipo resistente, a alocação de fotoassimilados para colmos e estruturas reprodutivas foi mais precoce, resultando em rápido decréscimo da RAF a partir dos 80 DAE (Figura 20). Altos valores de RAF indicam uma maior capacidade da planta interceptar energia luminosa e ocupar o espaço, tornando-as mais competitivas (FERREIRA et al., 2008).

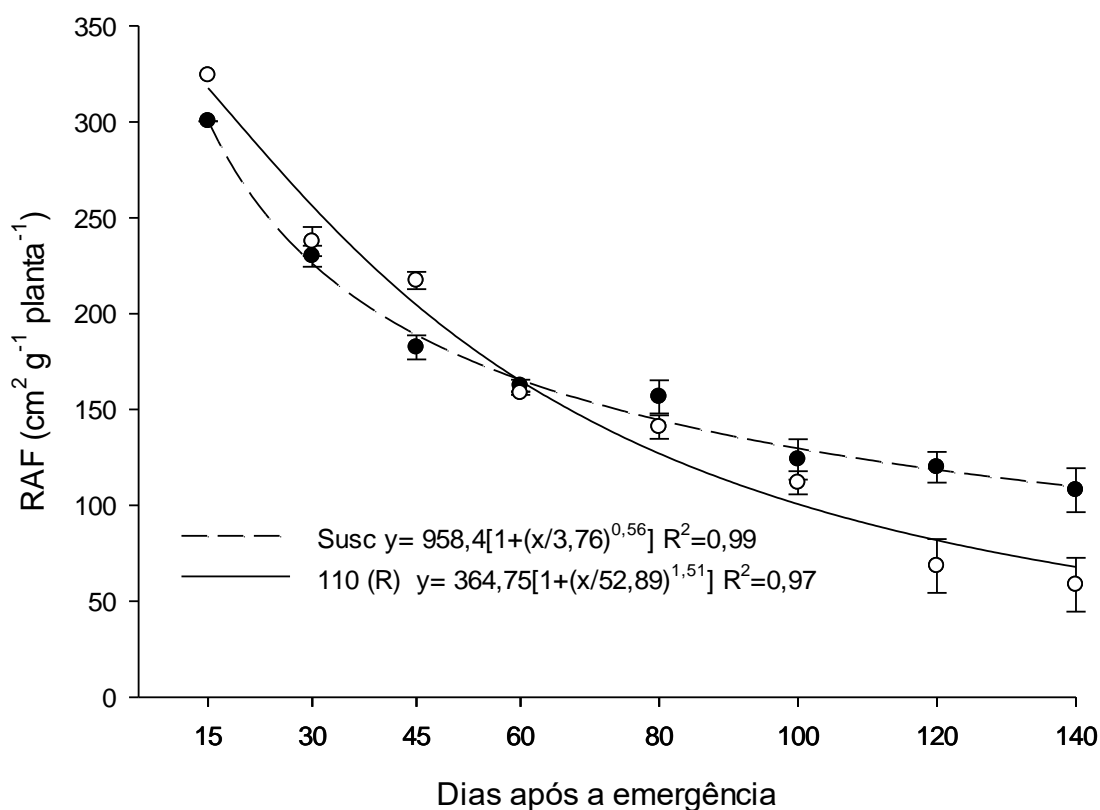


Figura 20-Razão da área foliar (RAF) de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) suscetível (Susc) e resistente (110), avaliados dos 15 aos 140 DAE. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2017. Os pontos representam os valores médios das repetições de cada biótipo em cada época, e as barras, os intervalos de confiança de cada tratamento.

Para ambos os biótipos houve aumento da TCA à medida em que as plantas se desenvolveram, com estabilização da variável aos 80 DAE para o biótipo Susc e a partir dos 120 DAE para o biótipo 110 (Figura 21). Dessa forma, verificou-se que o biótipo 110 possui maior velocidade de crescimento que pode ser explicado pelo seu ciclo mais curto, resultando em crescimento mais intenso, e acúmulo de fotoassimilados antecipadamente consistindo em vantagem competitiva. A TCA indica variação ou incremento entre duas amostragens sucessivas, isto é, indica a velocidade de crescimento ( $\text{g planta dia}^{-1}$  ou semana) (BENINCASA, 2004).

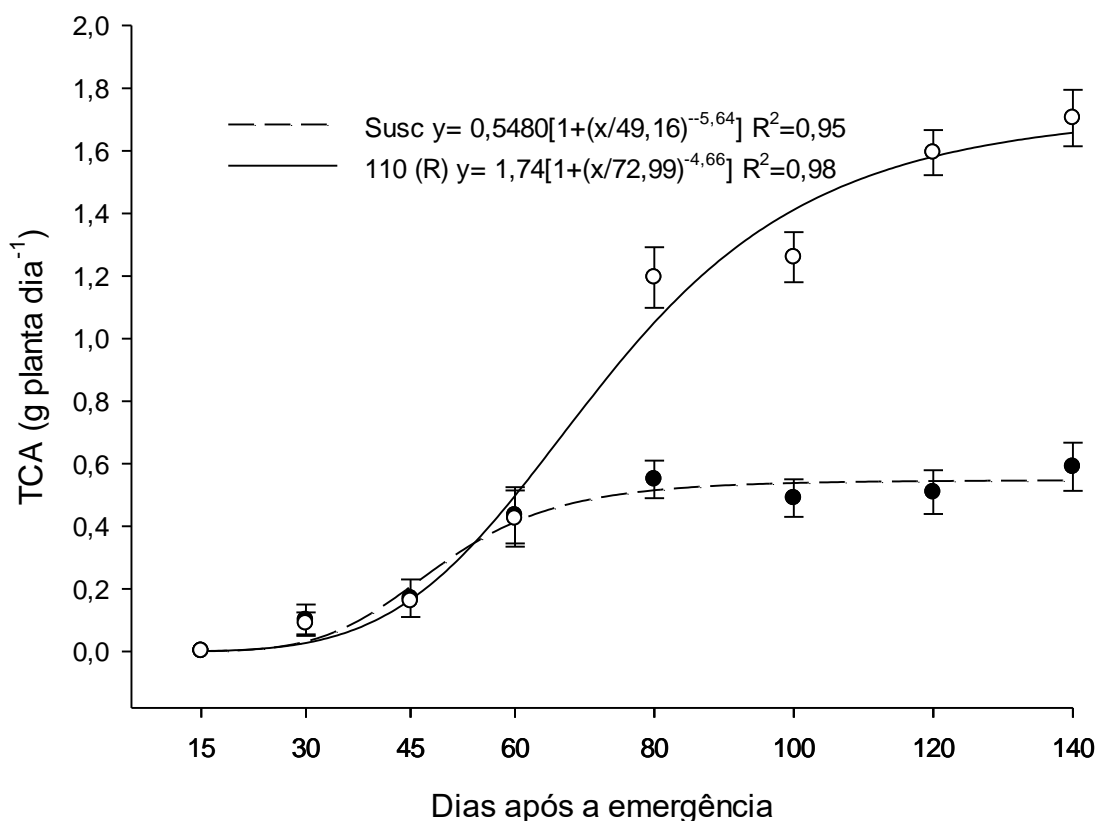


Figura 21- Taxa de crescimento absoluto (TCA) de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) suscetível (Susc) e resistente (110), avaliados dos 15 aos 140 DAE. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2017. Os pontos representam os valores médios das repetições de cada biótipo em cada época, e as barras, os intervalos de confiança de cada tratamento.

Pode-se observar neste trabalho que para as variáveis EP, MMSPA e TCA o biótipo suscetível 110 mostrou-se superior em comparação ao biótipo Susc (Figura 16, 17 e 21). Já, para as variáveis NA e RAF observou-se melhor desempenho do biótipo Susc (Figura 15 e 20). Efeitos pleiotrópicos não foram observados em biótipos de azevém resistentes a iodosulfurom-metilico (MARIANI et al., 2016b); biótipos de *Amaranthus palmeri* resistentes ao glifosato (VILA-AIUB et al., 2014); e, biótipos de azevém com baixo nível de resistência a fluazifop (FRAGA et al., 2013).

A ausência de custos adaptativos de populações de plantas daninhas resistentes é um fator importante envolvido na velocidade da evolução da resistência e serve para estimar a adaptabilidade ecológica de biótipos resistentes e suscetíveis aos herbicidas (CHRISTOFFOLETI; WESTRA; MOORE, 1997; GRAY et al., 1995). A nível de lavoura, verifica-se o domínio dos biótipos resistentes sobre os suscetíveis, em função da alta pressão de seleção ocasionada pelo controle das plantas suscetíveis, devido ao uso repetido de mesmo herbicida (SILVA; SILVA, 2007). Nesse sentido, a adoção de práticas culturais e/ou associadas com outros métodos de



controle que favoreçam o biótipo suscetível deverá ser considerada uma estratégia fundamental para manejar áreas com plantas daninhas resistentes (VARGAS et. al., 2005).

### 4.3.3 Habilidade Competitiva

Em relação ao experimento de habilidade competitiva entre o biótipo de azevém resistente e suscetível ao glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam, o teste de normalidade demonstrou não ser necessária a transformação dos dados.

De acordo com os critérios estatísticos usados para considerar a ocorrência de diferenças entre as curvas de PR e PRT em pelo menos duas proporções, não foram observadas diferenças entre os biótipos avaliados em nenhuma das variáveis analisadas (Figura 22a,b,c,d; tabela 9).

Embora não significativo pelos critérios adotados, observou-se diferença na PR, para a variável NA. Verificou-se que quando o biótipo 110 ocupava a maior proporção no nicho, houve aumento do NA resultando em redução do afilamento do biótipo Susc, ou seja, ocorreu prejuízo apenas no afilamento do biótipo Susc à medida que se reduziu sua proporção no nicho (Figura 22a e tabela 9).

Com relação à EP houve aumento da PR e PRT para o biótipo suscetível quando ambos biótipos ocuparam o nicho em proporções iguais (50:50%) (Figura 22b e tabela 9). A formação de colmos mais longos devido ao estiolamento é um processo fisiológico que afeta a expressão de genes envolvidos na resposta a luz e na evitação a sombra. Quanto maior a habilidade competitiva e capacidade da planta em interceptar a luminosidade, maior será a sua capacidade de assimilar CO<sub>2</sub> e produzir fotoassimilados. Também o aumento da estatura possibilita o sombreamento da planta que está em competição diminuindo a fotossíntese líquida e conseqüentemente suprimindo o seu desenvolvimento.

Para a variável AF não foram encontradas diferenças entre os biótipos nas diferentes proporções. Já para a MMSPA na proporção de 25:75 % verificou-se tendência de redução da PRT. Apenas o biótipo Susc reduziu mais do que esperado a PR, indicando que, pequenas proporções do biótipo resistente podem acarretar em prejuízo no crescimento da população suscetível (Figura 22d, tabela 9). Ou seja, ocorreu competição pelos recursos e um maior período de competição associado à

pressão de seleção imposta herbicida no qual o biótipo 110 é resistente, pode favorecer a predominância da população resistente ao longo das gerações

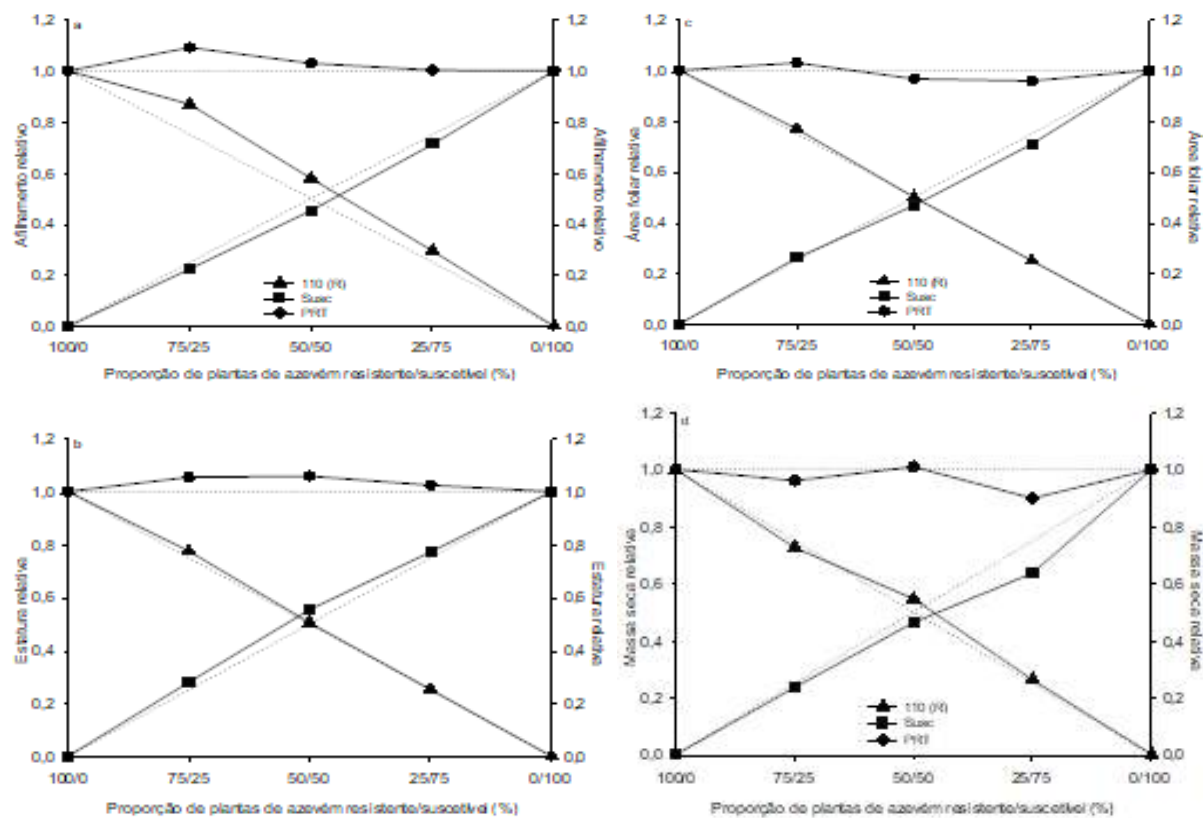


Figura 22 -Produtividade relativa (PR) e total (PRT) para: a) afilhamento; b) estatura; c) área foliar relativa; d) massa da matéria seca de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) resistente (110) e suscetível (Susc). FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2017. Triângulos (▲) representam a PR do biótipo de azevém resistente, quadrados (■) a PR do biótipo suscetível e círculos (●) indicam a PRT. Linhas pontilhadas referem-se às produtividades relativas hipotéticas, quando não ocorre interferência de uma espécie sobre a outra.

Tabela 9- Diferenças relativas de produtividade (PR) e produtividade relativa total (PRT), para as variáveis número de afilhos, estatura, área foliar e massa seca da parte aérea, nas proporções plantas de azevém (*Lolium multiflorum*) resistente (110) e suscetível (Susc). FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2017.

Biótipo	Proporção (%) de plantas associadas (resistente: suscetível)		
	75:25	50:50	25:75
	Número de afilhos		
110 (R)	0,12 ( $\pm 0,05$ ) <sup>ns</sup>	0,08 ( $\pm 0,04$ ) <sup>ns</sup>	0,04 ( $\pm 0,02$ ) <sup>ns</sup>
Susc	-0,03 ( $\pm 0,01$ ) <sup>*</sup>	-0,05 ( $\pm 0,03$ ) <sup>ns</sup>	0,05 ( $\pm 0,03$ ) <sup>ns</sup>
Total	1,09 ( $\pm 0,05$ ) <sup>ns</sup>	1,03 ( $\pm 0,06$ ) <sup>ns</sup>	1 ( $\pm 0,02$ ) <sup>ns</sup>
	Estatura		
110 (R)	0,02 ( $\pm 0,02$ ) <sup>ns</sup>	0,00 ( $\pm 0,02$ ) <sup>ns</sup>	0,00 ( $\pm 0,02$ ) <sup>ns</sup>
Susc	0,03 ( $\pm 0,01$ ) <sup>ns</sup>	0,05 ( $\pm 0,01$ ) <sup>*</sup>	0,02 ( $\pm 0,02$ ) <sup>ns</sup>
Total	1,05 ( $\pm 0,04$ ) <sup>ns</sup>	1,06 ( $\pm 0,03$ ) <sup>*</sup>	1,02 ( $\pm 0,02$ ) <sup>ns</sup>
	Área foliar		
110 (R)	0,02 ( $\pm 0,03$ ) <sup>ns</sup>	0,00 ( $\pm 0,03$ ) <sup>ns</sup>	0,00 ( $\pm 0,02$ ) <sup>ns</sup>
Susc	0,01 ( $\pm 0,03$ ) <sup>ns</sup>	-0,03 ( $\pm 0,04$ ) <sup>ns</sup>	-0,04 ( $\pm 0,05$ ) <sup>ns</sup>
Total	1,03 ( $\pm 0,03$ ) <sup>ns</sup>	0,97 ( $\pm 0,05$ ) <sup>ns</sup>	0,96 ( $\pm 0,06$ ) <sup>ns</sup>
	Massa da matéria seca da parte aérea		
110 (R)	-0,02 ( $\pm 0,02$ ) <sup>ns</sup>	0,05 ( $\pm 0,04$ ) <sup>ns</sup>	0,01 ( $\pm 0,02$ ) <sup>ns</sup>
Susc	-0,01 ( $\pm 0,02$ ) <sup>ns</sup>	-0,05 ( $\pm 0,05$ ) <sup>ns</sup>	-0,11 ( $\pm 0,05$ ) <sup>ns</sup>
Total	0,96 ( $\pm 0,03$ ) <sup>ns</sup>	1,01 ( $\pm 0,09$ ) <sup>ns</sup>	0,90 ( $\pm 0,05$ ) <sup>ns</sup>

<sup>ns</sup> Não significativo; <sup>\*</sup> significativo pelo teste t ( $p \leq 0,05$ ). Valores entre parênteses representam os erros padrões das médias.

Para as variáveis morfológicas NA, EP, AF e MMSPA não houve diferença entre os biótipos demonstrando que os mesmos não são afetados pela competição intraespecífica para as variáveis analisadas (Tabela 10). Em trabalhos avaliando a competição intraespecífica de biótipos resistentes aos inibidores da ALS, para várias espécies não foram encontradas diferenças na habilidade competitiva (SIBONY & RUBIN, 2003; ASHIGH & TARDIF, 2009; LAMEGO; VIDAL; BURGOS, 2011; LÉGÈRE et al., 2013). Biótipos de azevém com baixo nível de resistência a fluazifop também não apresentaram diferenças na habilidade competitiva (FRAGA et al., 2013).

Tabela 10- Respostas para número de afilhos, estatura, área foliar e matéria seca da parte aérea de biótipo de azevém (*Lolium multiflorum*) resistente (110) competindo com biótipo suscetível (Susc) sob diferentes proporções de plantas. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2017.

Biótipo	Proporção de plantas associadas (resistente: suscetível)				C.V. (%)	
	100:0	75:25	50:50	25:75		0:100
	Número de afilhos (n°/planta)					
110 (R)	5,49	5,83 <sup>ns</sup>	6,23 <sup>ns</sup>	6,344 <sup>ns</sup>	-	12,75
Susc	-	6,50 <sup>ns</sup>	6,57 <sup>ns</sup>	6,88 <sup>ns</sup>	7,29	9,19
	Estatura (cm/planta)					
110 (R)	40,85	42,20 <sup>ns</sup>	41,21 <sup>ns</sup>	41,24 <sup>ns</sup>	-	5,34
Susc	-	40,57 <sup>ns</sup>	40,34 <sup>ns</sup>	37,37 <sup>ns</sup>	36,34	6,38
	Área Foliar (cm <sup>2</sup> /planta)					
110 (R)	93,85	96,24 <sup>ns</sup>	93,68 <sup>ns</sup>	93,77 <sup>ns</sup>	-	10,05
Susc	-	94,31 <sup>ns</sup>	84,60 <sup>ns</sup>	85,51 <sup>ns</sup>	90,52	13,08
	Massa seca da parte aérea (g/planta)					
110 (R)	0,42	0,41 <sup>ns</sup>	0,46 <sup>ns</sup>	0,44 <sup>ns</sup>	-	12,08
Susc	-	0,45 <sup>ns</sup>	0,45 <sup>ns</sup>	0,48 <sup>ns</sup>	0,41	16,64

<sup>ns</sup> Não significativo e \* significativo em relação ao respectivo monocultivo (100%), pelo teste de Dunnett ( $p \leq 0,05$ ). C. V. – Coeficiente de variação.

Através dos índices CR, K e C, foi observada diferença significativa para a variável EP onde CR foi maior que 1 e C inferior a zero para o biótipo suscetível, sendo considerado mais competitivo que o biótipo resistente (Tabela 11).

Tabela 11-Índices de competitividade de biótipo de azevém (*Lolium multiflorum*) resistente (110) e suscetível (Susc), expressos por competitividade relativa (CR), coeficientes de agrupamento relativo (K) e de competitividade (C). FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2017.

	CR	Ka <sup>5</sup>	Kb <sup>6</sup>	C
AF <sup>1</sup>	1,07 ( $\pm 0,03$ ) <sup>ns</sup>	1,02 ( $\pm 0,12$ ) <sup>ns</sup>	0,88 ( $\pm 0,07$ ) <sup>ns</sup>	0,03 ( $\pm 0,02$ ) <sup>ns</sup>
MMSPA <sup>2</sup>	1,20 ( $\pm 0,09$ ) <sup>ns</sup>	1,26 ( $\pm 0,20$ ) <sup>ns</sup>	0,91 ( $\pm 0,17$ ) <sup>ns</sup>	0,08 ( $\pm 0,04$ ) <sup>ns</sup>
EP <sup>3</sup>	0,91 ( $\pm 0,03$ ) <sup>*</sup>	1,03 ( $\pm 0,09$ ) <sup>ns</sup>	1,24 ( $\pm 0,05$ ) <sup>ns</sup>	-0,05 ( $\pm 0,01$ ) <sup>*</sup>
NA <sup>4</sup>	1,30 ( $\pm 0,05$ ) <sup>ns</sup>	1,45 ( $\pm 0,23$ ) <sup>ns</sup>	0,84 ( $\pm 0,12$ ) <sup>ns</sup>	0,13 ( $\pm 0,05$ ) <sup>ns</sup>

<sup>1</sup>Área foliar; <sup>2</sup>Massa da matéria seca da parte aérea; <sup>3</sup>Estatura; <sup>4</sup>Número de afilhos; <sup>5</sup>Ka – biótipo 110; <sup>6</sup>Kb – biótipo Susc; <sup>ns</sup> Não significativo e \* significativo pelo teste t ( $p \leq 0,05$ ). Valores entre parênteses representam os erros padrões das médias.

Os resultados observados já eram esperados devido os biótipos serem da mesma espécie e também da mesma região geográfica (Tabela 10 e 11). Dessa forma conclui-se que não há custo adaptativo para o biótipo 110 e que a habilidade competitiva de ambos é semelhante o que é preocupante, pois a falta de efeitos negativos em biótipos resistentes favorece a evolução, a propagação e a competitividade dessas espécies nos sistemas agrícolas (LÉGÈRE et al., 2013).

Em síntese verificou-se que o maior período de afilhamento do azevém resistente é o principal fator envolvido na diferença do desenvolvimento fenológico entre os biótipos. Não houve custo adaptativo para o biótipo resistente, sendo que ele foi superior ao suscetível quanto a EP, MMSPA e TCA, enquanto que o suscetível possui maior NA e RAF. Com relação a habilidade competitiva não se observou

diferença entre os biótipos nas diferentes proporções testadas quando ocupam o mesmo nicho ecológico.

A falta de efeitos negativos em biótipos resistentes favorece a evolução, a propagação e a competitividade dessas espécies nos sistemas agrícolas (LÉGÈRE et al., 2013). Atenção especial deve ser dada aos biótipos resistentes que não possuem custo de adaptação pois os mesmos podem comprometer os sistemas de cultivo, podendo inviabiliza-los em áreas com esses biótipos, principalmente em culturas como o trigo, onde o azevém é a principal planta daninha.

Diante deste cenário é fundamental que se pense no sistema produtivo como um todo. Deve-se buscar a adoção do manejo integrado de plantas daninhas, ou seja, além dos métodos químicos, devem-se ser utilizados outros métodos como físico e cultural, com o objetivo de minimizar a reprodução e o reabastecimento dos bancos de sementes de plantas daninhas no solo, bem como sua dispersão para outras áreas. Atitudes proativas são imprescindíveis para contribuir com a sustentabilidade da atividade agrícola do ponto de vista da resistência de plantas daninhas aos herbicidas, garantindo a máxima produtividade das culturas e rentabilidade aos agricultores.

#### **4.4 Conclusões**

O biótipo Susc completou seu ciclo em 191 dias e o biótipo 110 em 153 dias, onde a principal diferença ocorre no estágio de afilhamento.

Em geral não há diferenças entre os biótipos 110 e Susc com relação ao valor adaptativo.

Não há diferença na habilidade competitiva entre os biótipos 110 e Susc.

## **5 CONCLUSÕES**

O biótipo de azevém 110 possui resistência múltipla aos herbicidas inibidores da enzima EPSPs e ALS e resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS dos grupos das sulfonilureias e triazolopirimidinas.

O mecanismo de resistência ao glifosato do biótipo 110 não é devido a insensibilidade total da EPSPs ao glifosato.

A resistência do biótipo 110 é resultado da insensibilidade da enzima ALS ao herbicida iodosulfurom-metílico sódio.

O biótipo 110 não apresenta metabolismo do glifosato, iodosulfurom-metílico e piroxsulam pelo complexo cyt-P450 no que se refere à inibição por malathion ou butóxido de piperonila (PBO).

Não há diferença na habilidade competitiva entre os biótipos 110 e Susc.

## Referências

AHMAD-HAMDANI, M.S. et al. Herbicide resistance endowed by enhanced rates of herbicide metabolism in wild oat (*Avena spp.*). **Weed Science**, v.61, p.55-62, 2013.

ALARCÓN-REVERTE, R. et al. Resistance to Glyphosate in Junglerice (*Echinochloa colona*) from California. **Weed Science**, v. 61, p. 48–54, 2013.

AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Berthier, 2009. 352 p.

AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Editora UFPel, 2014, 399p.

AGUINAGA, A.A.Q. et al. Morphological components and forage production of oat (*Avena strigosa*, Schreb) and annual ryegrass (*Lolium multiflorum*, Lam) pasture managed at different heights. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 1523–1530, 2008.

ASHIGH, J.; TARDIF, F. An amino acid substitution at position 205 of acetohydroxyacid synthase reduces fitness under optimal light in resistant populations of *Solanum ptychanthum*. **Weed Research**, v. 49, p.479–489, 2009.

ASHIGH, J.; TARDIF, F. An Ala205Val substitution in acetohydroxyacid synthase of Eastern black nightshade (*Solanum ptychanthum*) reduces sensitivity to herbicides and feedback inhibition. **Weed Science**, v. 55, p. 558–565, 2007.

BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: Funep, 2003. 41p

BIANCHI, M.A., FLECK N.G., LAMEGO F.P. Proporção entre plantas de soja e plantas competidoras e as relações de interferência mútua. **Ciência Rural**, v. 36, p.1380-1387, 2006.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BROSNAN, J. T. et al. A new amino acid substitution (Ala-205-Phe) in acetolactate synthase (ALS) confers broad spectrum resistance to ALS-inhibiting herbicides. **Planta**, v.243, 149–159, 2015.

BURGOS, N.R. et al. Review: confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. **Weed Science**, v.61, p.4-20, 2013.

CALSINA, L.M. et al. Size/density compensation in *Chloris gayana* Kunth cv. Fine Cut subjected to different defoliation regimes. **Grass and Forage Science**, v.67, p.255-262, 2012.

CARÁMBULA, M. **Pasturas y forrajes**. Potenciales y alternativas para producir forraje. Editorial Agropecuario Hemisferio Sur, Montevideo, Tomo I, 2007. 357p.  
CARDINALI, V.C.B. et al. Shikimate Accumulation, Glyphosate Absorption and Translocation in Horseweed Biotypes. **Planta Daninha**, v. 33, p. 109–118, 2015.

CARVALHO, S.J.P. de; et al. Crescimento e desenvolvimento da planta daninha capim-camalote. **Bragantia**, v.64, p.591-600, 2005.

CECHIN, J. et al. Mutation of Trp-574-Leu ALS gene confers resistance of radish biotypes to iodosulfuron and imazethapyr herbicides. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 39, p. 299–306, 2017.

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.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; WESTRA, P.; MOORE, F. Growth analyses of sulfonylurea - resistant and susceptible kochia (*Kochia scoparia*). **Weed Science**, v.45, p.691-695, 1997.

CHRISTOPHER, J.T.; PRESTON, C.; POWLES, S.B. Malathion antagonizes metabolism-based chlorsulfuron resistance in *Lolium rigidum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.49, p.172-182, 1994.



COBB, A.H.; READE, J.P.H.; **Herbicides and plant physiology**. Wiley-Blackwell, 2010, 296 p.

CÔRREA M. da C., CAMPOS M.B.S. de, MONQUERO, P.A. Impacto de herbicidas utilizados em cana-de açúcar sobre *Cotesia flavipes*. **Pesticidas: ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 24; p.53-60, 2014.

COUSENS, R. Aspects of the design and interpretation of competition (interference) experiments. **Weed Technology**, v.5, p.664-673, 1991.

CROMARTIE, T.H.; POLGE, N.D. An improved assay for shikimic acid and its use as a monitor for the activity of sulfosate. **Proceedings of the Weed Science Society of America**, v.40, p.291, 2000.

DAL MAGRO, T. et al. Enzymatic properties of *Cyperus difformis* ALS enzyme and mechanism resistance of the species to pyrazosulfuron-ethyl herbicide. **Ciência Rural**, v. 40, p. 2439–2445, 2010.

DÉLYE, C. et al. A new insight into arable weed adaptive evolution: mutations endowing herbicide resistance also affect germination dynamics and seedling emergence. **Annals of Botany**, v. 111, p. 681–691, 2013.

DEVINE, M.D.; EBERLEIN, C.V. Physiological, biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites. In: Roe, R.M., Burton, J.D., Kuhr, R.J. (Eds.), **Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology**. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands, p.159-185, 1997.

DEVINE, M.D.; SHUKLA, A. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. **Crop Protection**, v.19, p.881-889, 2000.

DEWAELE, E. et al. Biochemical characterization of chlorsulfuron resistance in *Cichorium intybus* L. var. Witloof. **Journal Plant Physiology**, v.151, p.109-114, 1997.

DINELLI, G. et al. Physiological and molecular basis of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* (L.) Cronq. biotypes from Spain. **Weed Research**, v.48, p.257-265, 2008.

DUKE, S.O.; POWLES, S.B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, v.64, p.319-325, 2008.

DURNER, J.; GAILUS, V.; BÖGER, P. New aspects of inhibition of plant acetolactate synthase by chlorsulfuron and imazaquin. **Plant Physiology**, v.96, p.1144 – 1147, 1991.

EBERLEIN, C.V. et al. Altered acetolactate synthase activity in ALS-inhibitor resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed Science**, v. 45, p.212–17, 1997.

FENG, P.C.C. et al. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. **Weed Science**, v.52, p.498-505, 2004.

FERNÁNDEZ-MORENO, P.T.; BASTIDA, F.; DE PRADO, R. Evidence, Mechanism and Alternative Chemical Seedbank-Level Control of Glyphosate Resistance of a Rigid Ryegrass (*Lolium rigidum*) Biotype from Southern Spain. **Frontiers in Plant Science**, v.8, p. 1–16, 2017.

FERREIRA, E.A. et al. Potencial competitivo de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*). **Planta daninha**, v.26, p. 261-269, 2008.

FEYEREISEN, R. Insect P450 enzymes. **Annual Review of Entomology**, v.44, p.507-533, 1999.

FLECK, N.G. et al. Controle de papuã (*Brachiaria plantaginea*) em soja em função da dose e da época de aplicação do herbicida clethodim. **Planta Daninha**, v.26, p.375-383, 2008.

FLECK, N.G. et al. Interferência de *Raphanus sativus* sobre cultivares de soja durante a fase vegetativa de desenvolvimento da cultura. **Planta Daninha**, v.24, p.425-434, 2006.

FRAGA, D. et al. Adaptive value of ryegrass biotypes with low-level resistance and susceptible to the herbicide fluazifop and competitive ability with the wheat culture. **Planta Daninha**, v.31, p.875–885, 2013.

GALVAN, J. et al. Anatomia foliar de *Lolium multiflorum* sensível e resistente ao glifosato. **Planta Daninha**, v.30, p.407–413, 2012.

GAZZIERO, D.L.P. et al. Critérios para relatos oficiais estatísticos de biótipos de plantas daninhas resistentes a herbicidas. In: AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. (Eds.) **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Passo Fundo: Berthier, 2009, p.91-101.

GE, X. et al. Vacuolar glyphosate-sequestration correlates with glyphosate resistance in ryegrass (*Lolium* spp.) from Australia, South America, and Europe: A <sup>31</sup>P NMR investigation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.1243–1250, 2012.

GERWICK, B.C.; MIRELES, L.C.; EILERS, R.J. Rapid diagnosis of ALS/AHAS inhibitor herbicide resistant weeds. **Weed Technology**, v.7, p.519-524, 1993.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology Biochemistry**, v.48, p.909–930, 2010.

GOLDBERG, D. E.; LANDA, K. Competitive effect and response: Hierarchies and correlated traits in the early stages of competition. **Journal Ecology**, v. 79, p.1013-1030, 1991.

GRAY, J.A.; STOLTENBERG, D.E.; BALKE, N.E. Productivity and intraspecific competitive ability of a velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) biotype resistant to atrazine. **Weed Science**, v.43, p.619-626, 1995.

GUSTAFSON, D. J. et al. Competitive relationships of *Andropogon gerardii* (Big Bluestem) from remnant and restored native populations and select cultivated varieties. **Functional Ecology**, v. 18, p. 451-457, 2004.

HALL, L.M.; STROME, K.M.; HORSMAN, G.P. Resistance to acetolactate synthase inhibitors and quinclorac in a biotype of false clover (*Gallium spurium*). **Weed Science**, v.46, p.390-396, 1998.

HEAP, I. **International survey of herbicide resistant weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.com/summary/home.aspx>>. Acesso em: 17 dez . 2017.

HAN, H. et al. A novel amino acid substitution Ala-122- Tyr in ALS confers high-level and broad resistance across ALS-inhibiting herbicides. **Pest Management Science**, v.68, p.1164-1170, 2012.

HOFFMAN, M.L., BUHLER D.D. Utilizing *Sorghum* as a functional model of crop-weed competition. I. Establishing a competitive hierarchy. **Weed Science**, v.50, p.466-472, 2002.

HOLT, J.S.; RADOSEVICH, S.R. Differential growth of two common groundsel (*Senecio vulgaris*) biotypes. **Weed Science**, v.31, p.112-120, 1983.

HONGCHUN, W. et al. The role of cytochrome P450 monooxygenase in the different responses to fenoxaprop-P-ethyl in annual bluegrass (*Poa annua* L.) and short awned foxtail (*Alopecurus aequalis* Sobol.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.107, p.334–342, 2013.

JASIENIUK, M.; BRÛLÉ-BABEL, A.L.; MORRISON, I.N. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. **Weed Science**, v.44, p.176-193, 1996.

KAUNDUN, S.S. et al. A Novel W1999S Mutation and Non-Target Site Resistance Impact on Acetyl-CoA Carboxylase Inhibiting Herbicides to Varying Degrees in a UK *Lolium multiflorum* population. **Plos One**, v.8, p.1-11, 2013.

KISSMANN, K.G. **Resistência de plantas a herbicidas**. São Paulo: Basf Brasileira, p. 33, 1996. 33.

LAMEGO, F. P.; VIDAL, R. A.; BURGOS, N. R. Competitiveness of ALS inhibitors resistant and susceptible biotypes of Greater Beggarticks (*Bidens subalternans*). **Planta Daninha**, v.29, p.457–464, 2011.

LÉGÈRE, A. et al. Growth characterization of kochia (*Kochia scoparia*) with substitutions at Pro197 or Trp574 conferring resistance to acetolactate synthase–inhibiting herbicides. **Weed Science**, v.61, p.267–276, 2013.

LEMAIRE, G., 2001. Ecophysiological of Grasslands : Dynamics aspects of forage plant population in grazed swards. **Proceedings of the XIX International Grassland Congress**, São Pedro, São Paulo (Brasil), p. 10 - 21, 2001.

LETOUZE, A.; GASQUEZ, J. Enhanced activity of several herbicide-degrading enzymes: a suggested mechanism responsible for multiple resistance in blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds.). **Agronomie**, v.23, p.601-608, 2003.

LI, M. et al. ALS herbicide resistance mutations in *Raphanus raphanistrum*: evaluation of pleiotropic effects on vegetative growth and ALS activity. **Pest Management Science**, v.69, p.689–695, 2013.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4. ed. Instituto Plantarum, 2008. 640 p.

LÜBBERSTEDT, T.; SCHEJBEL, A.B.; BACH, H.P. Development of ryegrass allele-specific (GRASP) markers for sustainable grassland improvement – A new EU framework V project. *Czech J Genet Plant Breed*, v.39, p.125–128, 2003.

MAGALHÃES, A.C.N. Análise quantitativa do crescimento. In: FERRI, M. G. **Fisiologia vegetal**. São Paulo, EPU,. v.1, p.363 - 50, 1979.

MARIANI, F. et al. Resistência de biótipos de azevém ao herbicida iodosulfurometilíco sódio e herbicidas alternativos para o controle. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 115, p.35–43, 2016a.

MARIANI, F. et al. Valor adaptativo e habilidade competitiva de azevém resistente e suscetível ao iodosulfuron em competição com o trigo. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 51, p. 710–719, 2016b.

MASSA, D. et al. Target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Apera spicaventi* populations is conferred by documented and previously unknown mutations. **Weed Research**, v. 51, p.294-303, 2011.

MATZENBACHER, Felipe de Oliveira. **Caracterização e controle de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) resistente aos herbicidas do grupo das imidazolinonas e quinclorac em arroz irrigado**. 2012. 212f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MCKENZIE-GOPSILL AG. et al. Rapid and early changes in morphology and gene expression in soya bean seedlings emerging in the presence of neighboring weeds. **Weed Research**. v.56, p.267–273, 2016.

MOLIN, W.; WRIGHT, A.; NANDULA, V. Glyphosate-Resistant Goosegrass from Mississippi. **Agronomy**, v.3, p.474–487, 2013.

NOL, N. et al. Shikimate leaf disc assay for early detection of glyphosate resistance in *Conyza canadensis* and relative transcript levels of EPSPS and ABC transporter genes. **Weed Research**; v.52, p.233-41, 2012.

OERKE, E.C. Crop loss to pests. **Journal of Agricultural Science**, v.144, p.31-43, 2006.

PEIXOTO, C. P.; PEIXOTO, M. DE F. DA S. P. Dinâmica do crescimento vegetal: princípios básicos. **Tópicos Em Ciências Agrárias**, p.20, 2004.

POLOK, K. **Molecular evolution of the genus *Lolium* sp.** Olsztyn: Studio Poligrafii Komputerowej, 2007. 320 p.

PEREZ-JONES, A. et al. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. **Planta**, v.226, p.395-404, 2007.

PONTES, L. S. et al. Variáveis morfológicas e estruturais de azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) manejado em diferentes alturas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.814-820, 2003.

POWLES, S.B.; PRESTON, C. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. **Weed Technology**, v.20, p.282-289, 2006.

POWLES, S.B.; YU, Q. Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 317-347, 2010.

PRESTON, C. et al. Multiple effects of a naturally occurring proline to threonine substitution within acetolactate synthase in two herbicide-resistant populations of *Lactuca serriola*. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 84, p. 227–235, 2006.

PRESTON, C. et al. Multiple resistance to dissimilar herbicide chemistries in a biotype of *Lolium rigidum* due to enhanced activity of several herbicide degrading enzymes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.134, p.123–134, 1996.

RADOSEVICH, R.S.; HOLT J.S.; GHERSA C. **Ecology of weeds and invasive plants: relationship to agriculture and natural resource management.** New Jersey: Wiley-Interscience, 2007. 400 p.

RAUCH, T.A. et al. Widespread occurrence of herbicide-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Northern Idaho and Eastern Washington. **Weed Technology**, v. 24, p 281-288, 2010.

RIGOLI, R.P. et al. Habilidade competitiva de trigo (*Triticum aestivum*) em convivência com azevém (*Lolium multiflorum*) ou nabo (*Raphanus raphanistrum*). **Planta Daninha**, v. 26, p. 93-100, 2008.

ROMAN, E.S. et al. Resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao herbicida glifosato. **Planta Daninha**, v.22, p.301-306, 2004.

ROSO, A.C.; VIDAL, R.A. A modified phosphate-carrier protein theory is proposed as a non-target site mechanism for glyphosate resistance in weeds. **Planta Daninha**, v.28, p.1175-1185, 2010.

ROUSH, M.L. et al. A comparison of methods for measuring effects of density and proportion in plant competition experiments. **Weed Science**, v.37, p.268-275, 1989.

SALAS, R. A. et al. EPSPS Gene Amplification in Glyphosate-Resistant Italian Ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) populations from Arkansas (United States). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 5885–5893, 2015.

SAMMONS, R.D.; GAINES, T.A. Glyphosate resistance: State of knowledge. **Pest Management Science**, v. 70, p. 1367–1377, 2014.

SBCPD - SOCIEDADE BRASILEIRA DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS. **Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas**. Londrina: 1995. 42 p.

SEEFELDT, S.S.; JENSEN, J.E.; FUERST, E.P. Log-logistic analysis of herbicidedose-response relationships. **Weed Technology**, v.9, p.218-227, 1995.

SHANER, D.L. The role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. **Weed Science**, v.57, p.118–123, 2009.

SIBONY, M.; RUBIN, B. The ecological fitness of ALS-resistant *Amaranthus retroflexus* and multiple-resistant *Amaranthus blitoides*. **Weed Research**, v. 43, p. 40–47, 2003.

SIGMAPLOT – **Scientific Graphing Software**. Version 12.5, 2013.

SILVA, A.A. da.; SILVA, J.F. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa, Ed. UFV, 2007, 367p.

SUBRAMANIAN, M.V.; GERWICK, B.C. Inhibition of acetolactate synthase by triazolopyrimidines: a review of recent developments. In: Whitaker, J.R. and Sonnet, B.E. (eds) **Biocatalysis in Agricultural Biotechnology**. ACS Symposium Series No. 389. Washington, DC : American Chemical Society , p. 277 – 288, 1989.

TAN, M.K.; PRESTON, C.; WANG, G.X. Molecular basis of multiple resistance to ACCase-inhibiting and ALS inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. **Weed Research**, v.47, p. 534–541, 2007.

TEDESCO, M.J. et al. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10. ed. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2004. 401p

TIRONI, S.P. et al. Época de emergência de azevém e nabo sobre a habilidade competitiva da cultura da cevada. **Ciência Rural**, v.44, p.1527-1533, 2014.

TONETTO, C.J. et al. Produção e composição bromatológica de genótipos diploides e tetraploides de azevém. **Zootecnia Tropical**, v.29, p.169-178, 2011.

TRANEL, P.J.; WRIGHT, T.R. Resistance of weeds to ALS inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, v. 50, p.700–712. 2002.

ULGUIM, A. R. et al. Evaluation of the Mechanism Responsible for the Low-Level Resistance to Gluphosate in Goosegrass. **Planta Daninha**, v. 35, p. 1–11, 2017.

ULZURRUN, P. D. D.; LEADEN, M. I. Análisis de la sensibilidad de biotipos de *Lolium multiflorum* a herbicidas inhibidores de la enzima als, accasa y glyphosate. **Planta Daninha**, v. 30, p. 667–673, 2012.

URCHEI, M.A., RODRIGUES J.D., STONE L.F. Análise de crescimento de duas cultivares de feijoeiro sob irrigação, em plantio direto e preparo convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.497-506, 2000.

VARGAS, L. et al. Alteração das características biológicas dos biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) ocasionada pela resistência ao herbicida glifosato. **Planta Daninha**, v.23, p.153-160, 2005.

VARGAS, L et al. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. In: AGOSTINETTO, R.; VARGAS, L. (ed). **Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil**. Passo Fundo: Gráfica Berthier, 2009, p. 352.

VARGAS, L. et al. Resistência de plantas daninhas no Brasil: histórico, custo e o desafio do manejo no futuro. In: RIOS, A. **Viabilidad del glyphosate en sistemas productivos sustentables**. Montevideo p.111-118, 2013. (INIA. Serie Técnica, 204).

VARGAS, L. et al. Verification of the Mechanism of Glyphosate Resistance in Italian Ryegrass Biotypes. **Planta Daninha**, v. 34, p. 565–573, 2016.

VARGAS, Leandro. **Resistência de *Euphorbia heterophylla* L. aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS/AHAS)** 2000. 69 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.



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

VARGAS, L.; ROMAN, E.S. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas: conceitos, origem e evolução**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 22p. Documentos online, 58). Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/d\\_o/pdo58.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/d_o/pdo58.htm)> Acesso em: 26 out. 2017.

VILA-AIUB, M.M.; NEVE, P.; POWLES, S.B. Evidence for an ecological cost of enhanced herbicide metabolism in *Lolium rigidum*. **Journal Ecology**, v. 97, p.772–780, 2009a.

VILA- AIUB, M.M.; NEVE, P.; POWLES, S.B. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. **New Phytologist**, v. 184, p. 751–767, 2009b.

VILA-AIUB, M. M. et al. No fitness cost of glyphosate resistance endowed by massive EPSPS gene amplification in *Amaranthus palmeri*. **Planta**, v.239, p.793–801, 2014.

WARWICK, S.I.; BLACK, L.D. Relative fitness of herbicide-resistant and susceptible biotypes of weeds. **Phytoprotection**, v.75, p.37-49, 1994.

WERCK-REICHHART, D.; HEHN, A.; DIDIERJEAN, L. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. **Trends in Plant Science**, v.5, p.116-123, 2000.

XAVIER, E. et al. Acetolactate synthase activity in *Euphorbia heterophylla* resistant to ALS- and protox-inhibiting herbicides. **Planta Daninha**, v. 31, p. 867–874, 2013.

ZHU, J. et al. Transcriptome response to glyphosate in sensitive and resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.6355-6363, 2008.

YU, Q. et al. Evolution of a double amino acid substitution in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Eleusine indica* conferring high-level glyphosate resistance. **Plant Physiology**, v.167, p.1440-1447, 2015.

YU, Q. et al. Resistance evaluation for herbicide resistance– endowing acetolactate synthase (ALS) gene mutations using *Raphanus raphanistrum* populations homozygous for specific ALS mutations. **Weed research**, v.52, p.178-186, 2012.

YU, Q.; HAN, H.; VILA-AIUB, M.M. AHAS herbicide resistance endowing mutations: effect on AHAS functionality and plant growth. *Journal of Experimental Botany*. v. 61, p. 3925–3934, 2010.

YU, Q.; POWLES, S. Metabolism-Based Herbicide Resistance and Cross-Resistance in Crop Weeds: A Threat to Herbicide Sustainability and Global Crop Production. *Plant Physiology*, v. 166, p. 1106–1118, 2014.

YU, Q.; POWLES, S. B. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: Current understanding. *Pest Management Science*, v. 70, p. 1340–1350, 2013a.

## **VITA**

Jonas Rodrigo Henckes é filho de José Henckes e Leila Maria Bamberger. Nasceu em 19 de junho de 1993, no Município de Santo Cristo, Rio Grande do Sul. Formou-se Técnico Agropecuária na Escola Estadual Técnica Fronteira Noroeste em Santa Rosa/RS, no ano de 2010. No ano de 2011 ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), onde se graduou como Engenheiro Agrônomo em 2016. No período de 2011 a 2015 desenvolveu atividades como estagiário no laboratório de irrigação do Sistema Irriga e também foi bolsista no período de 2012 a 2014 no Programa de Educação Tutorial (PET) do curso de Agronomia. Em 2016, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/UFPel.