

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Tese

**Análise de transcriptoma e práticas de manejo para
redução do banco de sementes de *Lolium multiflorum* Lam.
resistente e suscetível ao glifosato**

Joanei Cechin

Pelotas, 2019

JOANEI CECHIN

Análise de transcriptoma e práticas de manejo para redução do banco de sementes de *Lolium multiflorum* Lam. resistente e suscetível ao glifosato

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

Orientador: Eng. Agr. Dr. Leandro Vargas

Coorientadores: Eng. Agr. Dr. Dirceu Agostinetti

Bacharel em Ciências Biológicas Dra. Daiane Pinho Benemann

Pelotas, 2019

Banca examinadora:

Eng. Agr. Dr. Anderson Luis Nunes

Bacharel em Ciênc. Biol. Dra. Vanessa Galli

Eng. Agr. Dr. André Andres

Bacharel em Ciênc. Biol. Dra. Daiane Benemann
(Coorientadora)

Eng. Agr. Dr. Leandro Vargas
(Orientador)

Aos meus pais, João Batista e Neuza Maria;
A minha irmã e cunhado, Jenesca e Claudinei.
A minha namorada Morgana.
As demais pessoas de minha família e amigos (as).

OFEREÇO E DEDICO

"O sucesso nasce do querer, da determinação e da persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca vencer os obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

(José de Alencar)

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida e por ter guiado meus caminhos e decisões para que pudesse ter êxito em todas as etapas da minha vida.

Aos meus pais, Joao Batista e Neuza Maria, minha irmã Jenesca, cunhado Claudinei e demais pessoas da minha família, que apesar da distância sempre estiveram comigo. Pelas todas as orações, apoio, incentivo, compreensão e carinho durante meu período na cidade de Pelotas e demais dias da minha vida.

À minha namorada Morgana Amanda Vequi, uma pessoa maravilhosa que esteve presente em todos os momentos, por demonstrar amor, confiança e incentivo, por sonhar comigo e ser parte importante desta conquista.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade (PPGFs-UFPel) pela oportunidade de realização do Doutorado e Mestrado, pelos professores e funcionários que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

Aos professores Dr. Leandro Vargas e Dr. Dirceu Agostinetti, por toda a competência em orientar, apoiar em todos os momentos, por dispor seu tempo em transmitir conhecimentos, pela dedicação, confiança, convivência e amizade nesses mais de seis anos. Fica meus mais sinceros agradecimentos.

À Universidade Federal de Pelotas, em especial, ao Centro de Estudos em Herbologia (CEHERB) e a Embrapa Trigo, por disponibilizar toda a estrutura necessária para a realização dos experimentos.

Meu agradecimento especial à Dra. Daiane Pinho Benemann que compartilhou conhecimentos, momentos de amizade, orientação profissional e dedicou seu tempo para auxiliar na execução de atividades do projeto.

Ao amigo Frederico Schmitt Kremer do Departamento de Biotecnologia, pela disposição nas análises do transcriptoma, conhecimento compartilhado e amizade.

Aos meus amigos e colegas de Pós-graduação do CEHERB, especialmente a Adriana Almeida do Amarante, Alcimar Mazon, Andrés Antonio Monge Vargas, Andressa Pitol, Claudia de Oliveira, Cristiano Piasecki, Daniela Tessaro, Edna Almeida de Sousa, Elisa Souza Lemes, Fernanda Cassiane Caratti, Francisco de Assis Puyol Goulart, Jéssica Rodrigues Garcia, Jonas Rodrigo Henckes, Juliano Gazola, Laís Tessari Perboni, Maicon Fernando Schmitz, Matheus Bastos Martins, Queli Ruchel e Renan Ricardo Zandoná pela amizade, bons momentos de convivência, incentivo e auxílio na execução dos experimentos.

Aos bolsistas e estagiários que auxiliaram na condução dos experimentos pela amizade e companheirismo. Além disso, resevo meu agradecimento ao amigo Junior Sandri e ao Christopher Mingotti que, em nome das Empresas Dom Mário e Pionner, disponibilizaram sementes de soja e milho para execução dos experimentos.

Minha gratidão aos meus amigos e colegas do apto 301: Andres Monge Vargas, Anderson Bolzan, Giovani Smaniotto, Gustavo Zimmer, Luciano Stöhlirck e Mateus Pino pela amizade, convívio, paciência, bons momentos e conselhos para a vida. Ficarão boas lembranças deste período e a certeza de que a amizade permanecerá bem conservada mesmo com o tempo.

Meu agradecimento estende-se a todos os meus amigos que fazem parte da minha vida, pelos momentos vividos nesses anos e pela verdadeira amizade marcada através de pequenos gestos que fazem a diferença no nosso cotidiano. A vida tem mais graça e fica mais completa quando temos Deus, família e amigos.

Muito obrigado a todos!

Resumo

CECHIN, Joanei. **Análise de transcriptoma e práticas de manejo para redução do banco de sementes de *Lolium multiflorum* Lam. resistente e suscetível ao glifosato.** 2019. 189f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) é uma espécie forrageira de inverno amplamente utilizada como planta de cobertura de solo e considerada planta daninha em trigo e cevada, afetando o desenvolvimento e produtividade. A utilização de glifosato visa o controle da espécie e semeadura de culturas em sucessão em áreas limpas. Porém, o uso repetido do herbicida para controle do azevém contribuiu na seleção de biótipos resistentes. Os objetivos da pesquisa foram determinar o mecanismo de resistência em biótipos de azevém através da análise de transcriptoma e quantificação da expressão relativa de genes candidatos; avaliar práticas de manejo para redução do banco de sementes do solo; e analisar o ciclo de vida, adaptabilidade e habilidade dos genótipos de azevém tetraploide e diploide. O screening inicial dos biótipos coletados em áreas do Estado do Rio Grande do Sul foi conduzido em casa de vegetação. A confirmação da resistência dos biótipos selecionados foi obtida através de curva dose resposta. Os genes candidatos em resposta ao glifosato foram obtidos após análise do transcriptoma de plantas resistentes e suscetíveis submetidas ou não ao herbicida glifosato na dose de 2160 g e.a. ha⁻¹, com coleta do material vegetal 24 horas após aplicação, seguido de extração de RNA e sequenciamento em plataforma Illumina. Os genes diferencialmente expressos (DEGs) foram quantificados em RT-qPCR, usando os genes endógenos RNA ribossomal 18s (18s) e fator de alongação 1-A (eEF1As) como normalizadores da expressão gênica. O acúmulo de chiquimato, alinhamento do gene EPSPs, uso de inibidores da citocromo P₄₅₀ monooxigenase e atividade de enzimas antioxidantes foram avaliadas de maneira complementar para elucidar e confirmar o mecanismo de resistência. As práticas de manejo para redução do banco de sementes foram avaliadas em experimentos conduzidos a campo, casa de vegetação e laboratório. A adaptabilidade e habilidade competitiva dos genótipos de azevém tetraploide e diploide foi avaliada em casa de vegetação. O screening inicial demonstrou que a resistência do azevém ao glifosato ocorreu para 44% dos biótipos coletados e, a curva dose resposta evidenciou que a GR₅₀ do biótipo suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) foi de 225 e 2275 g e.a. ha⁻¹ do herbicida glifosato, respectivamente. Os resultados do transcriptoma demonstraram expressão diferencial de 102 e 50 genes up- e down-regulados em resposta ao glifosato para o

biótipo SVA04, respectivamente. Após anotação das DEGs, o mecanismo de resistência em azevém envolve a expressão diferencial da citocromo P₄₅₀, protein detox, glicosiltransferase, ABC transporters (ABC 2 e ABC 4) e peroxidases. Além disso, houve redução no acúmulo de chiquimato, metabolização parcial e atividade diferencial de enzimas antioxidantes para o biótipo resistente. O azevém apresentou baixa viabilidade no banco de sementes do solo para enterrio até 20cm. A utilização de plantas supressoras como centeio, aveia-preta e ervilhaca; aplicação dos herbicidas piroxasulfone e alachlor na pré emergência do trigo; revolvimento do solo com arado seguido de semeadura antecipada do milho como cultura sucessora; e inviabilização das sementes com os herbicidas paraquat e glufosinato de amônio aplicados até o estágio de antese foram práticas de manejo que auxiliaram na redução da população infestante e banco de sementes do solo ao longo do tempo. O azevém tetraploide apresenta maior ciclo de vida comparado ao diploide devido aumento do período de afilhamento, com aumento significativo no número de filhotes por planta, acúmulo de área foliar e massa seca que proporcionou maior valor adaptativo e habilidade competitiva em relação ao azevém diploide.

Palavras-chave: Azevém; inibidores da enzima EPSPs; mecanismos de resistência; técnicas moleculares; métodos de controle; culturas alternativas.

Abstract

CECHIN, Joanei. **Transcriptome analysis and practices of management to reduce the seed bank of resistant and susceptible *Lolium multiflorum* Lam. to glyphosate.** 2019. 189f. Thesis (Doctoral) - Graduate Program in Plant Protection. Federal University of Pelotas, Pelotas.

The Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) is a winter forage species widely used as a soil cover plant and, considered weed in wheat and barley crops, affecting the development and yield. The use of glyphosate aims the specie control and sowing of succession crops in free fields. However, the repeated use of herbicide to Italian ryegrass control contributed to the selection of resistant biotypes. The objectives of this research were to determine the resistance mechanism in Italian ryegrass biotypes through transcriptome analysis and quantification the relative expression of candidate genes; evaluate management practices to reduce the soil seed bank; and analyze the life cycle, adaptability and competitive ability of tetraploid and diploid Italian ryegrass genotypes. The initial screening of biotypes collected in areas of the Rio Grande do Sul State was conducted under greenhouse conditions. The resistance confirmation of the selected biotypes was obtained through a dose response curve. Candidate genes in response to glyphosate were obtained after transcriptome analysis of resistant and susceptible plants submitted or not to glyphosate herbicide at rate of 2160 g a.e. ha⁻¹, with plant material harvested at 24 hours after application, followed by RNA extraction and sequencing on the Illumina platform. Differentially expressed genes (DEGs) were measured in RT-qPCR using the endogenous genes of 18s ribosomal RNA (18s) and elongation factor 1-A (eEF1As) as normalizers of gene expression. The shikimate accumulation, EPSPs gene alignment, use of cytochrome P₄₅₀ monooxygenase inhibitors, and activity of antioxidant enzymes were evaluated in a complementary manner to elucidate and confirm the resistance mechanism. The management practices for the reduction soil seed bank were evaluated in the field, greenhouse and laboratory experiments. The life cycle, adaptability, and competitive ability of tetraploid and diploide Italian ryegrass was evaluated in greenhouse. The initial screening demonstrates that Italian ryegrass resistance to glyphosate occurred in 44% of biotypes, and the dose response curve showed that GR₅₀ of susceptible (SVA02) and resistant (SVA04) biotypes was 225 and 2275 g a.e. ha⁻¹ of glyphosate herbicide, respectively. The results of transcriptome analysis demonstrated differential expression of 102 and 50 up- and down-regulated genes in response to glyphosate for the SVA04 biotype, respectively. After DEGs annotation, the resistance mechanism in Italian ryegrass involves the differential expression of cytochrome P₄₅₀, protein detox,

glycosyltransferase, ABC transporters (ABC 2 e ABC 4 and peroxidases. In addition, reduction of shikimate accumulation was found, partial metabolization and differential activity of antioxidant enzymes for the resistant biotype. The Italian ryegrass showed low viability in the soil seed bank for burial depth until 20cm. The use of cover crops such as rye, black-oat and vetch; application of the pyroxasulfone and alachlor herbicides in the pre-emergence of wheat crop; soil disturbance with moldboard plow followed by early sowing of corn as successive crop; and seeds inviability with paraquat and ammonium-glufosinate herbicides sprayed in the anthesis stage were management practices to favor the reduction of weedy population and soil seed bank over long-term. The tetraploid Italian ryegrass has higher life cycle compared to the diploid due to extend of tillering time, with a significant increase in the tillers number per plant, leaf area accumulation and dry mass provide greater adaptive value and competitive ability than for the diploid ryegrass.

Key-words: Italian ryegrass; inhibiting of EPSPs enzyme; resistance mechanism; molecular techniques; control management; alternative crops.

Lista de Figuras

- Figura 1-** Esquema simplificado que foi desenvolvido para avaliação dos genes candidatos em resposta ao herbicida glifosato nos biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) para avaliar o mecanismo de resistência. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2019.39
- Figura 2-** Resposta percentual dos biótipos resistentes e suscetíveis (A), controle visual (B) e lista dos biótipos suscetíveis e resistentes ao glifosato (C) submetidos a dose de 2160 g ea. ha⁻¹ avaliados 28 dias após a aplicação. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2019.43
- Figura 3-** Curva dose-resposta para controle visual (A) e massa seca da parte aérea (B) dos biótipos de azevém submetidos a diferentes doses do herbicida glifosato. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2019.44
- Figura 4-** Distribuição das contigs quanto ao comprimento dos transcritos montados das bibliotecas do transcriptoma sequenciadas em biótipos de azevém suscetível e resistente. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2019.46
- Figura 5-** Transcritos conservados (%) dos biótipos de azevém suscetível e resistente ao glifosato em diferentes espécies. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2019.47
- Figura 6-** Classificação individual das DEGs quanto ao processo biológico e função molecular em biótipos de azevém suscetível e resistente ao glifosato. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2019.48
- Figura 7-** Ma plot das DEGs geradas pelo EdgeR após filtragem com um valor mínimo de cobertura e Volcano plot comparando o false discovery rate entre os tratamentos. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2019.50

- Figura 8-** Diagrama de Venn representando o número de transcritos expressos (RPKM>10) em biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) ao glifosato submetidos ou não ao herbicida na dose de 2160 g e.a. ha⁻¹. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.51
- Figura 9-** Heat-map da correlação de Spearman's (A) e hierarchical clustering (B) dos níveis de expressão dos transcritos oriundos de todos os tratamentos (coluna) comparado contra cada par da amostra (linha). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.52
- Figura 10-** DEGs up- e down-regulated na comparação entre os grupos (A) e transcritos específicos (B) em biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) ao glifosato expressos 24 HAT. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.....53
- Figura 11-** Eficiência dos genes candidatos a referência em biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) ao glifosato para validação em RT-qPCR. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.....60
- Figura 12-** Estabilidade média de expressão (M) de acordo com o algoritmo NormFinder (A), BestKeeper (B), método comparativo ΔC_t (C), GeNorm software (D) e ranking geral (E) para os genes candidatos a normalização em biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) ao glifosato para validação em RT-qPCR. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.61
- Figura 13-** Expressão relativa dos genes peroxidase 1 (A), inositol kinase (B), ABC transporter (C) e CYT P450 71A1 (D) em resposta ao glifosato em biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.....62
- Figura 14-** Expressão relativa dos genes EPSPs (A), CYT P450 78A3 (B), glicosiltransferase (C) e glutathione (D) em resposta ao glifosato em biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.64
- Figura 15-** Expressão relativa dos genes CYT P450 (A), proteína detox (B), ABC transporter 4 (C) e peroxidase 2 (D) em resposta ao glifosato em biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS.....65

- Figura 16-** Acúmulo de ácido chiquímico (mg mL^{-1}) em biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) avaliado nos tempos zero, 24, 48, 96 e 192 horas após aplicação do herbicida glifosato na dose de $2160 \text{ g ea. ha}^{-1}$. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.78
- Figura 17-** Acúmulo de ácido chiquímico (mg mL^{-1}) em biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) em função de diferentes doses do herbicida glifosato avaliado 48 horas após aplicação. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.80
- Figura 18-** Número de cópias da EPSPs nos biótipos de azevém resistente (A) e suscetível (B) ao herbicida glifosato. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.84
- Figura 19-** Atividade das enzimas antioxidantes APX (A) e CAT (B) nos biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) em resposta ao herbicida glifosato na dose de $2160 \text{ g ea. ha}^{-1}$ avaliado em diferentes tempos após aplicação. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.86
- Figura 20-** Atividade das enzimas antioxidantes SOD (A) e H_2O_2 (B) nos biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) em resposta ao herbicida glifosato na dose de $2160 \text{ g ea. ha}^{-1}$ avaliado em diferentes tempos após aplicação. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.88
- Figura 21-** Atividade de TBARs nos biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) em resposta ao herbicida glifosato na dose de $2160 \text{ g e.a. ha}^{-1}$ avaliado em diferentes tempos após aplicação. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.89
- Figura 22-** Esquema simplificado sobre os mecanismos de resistência envolvidos na sobrevivência do biótipo de azevém SVA04. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.90
- Figura 23-** Percentagem de germinação de sementes de azevém viáveis não dormentes avaliado em diferentes profundidades de enterrio. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.107
- Figura 24-** Percentagem de sementes resgatadas (A) e de germinação (B) avaliado em diferentes tempos e profundidades de enterrio. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.108

Figura 25- Percentagem de plântulas anormais (A) e sementes mortas/deterioradas e predadas (B) avaliado em diferentes tempos e profundidades de enterrio. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	110
Figura 26- Percentagem de sementes dormentes viáveis (A) e dormentes não-viáveis (B) avaliado em diferentes tempos e profundidades de enterrio. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	112
Figura 27- Representação do cromatograma para os hormônios da dormência AIA, ABA e GA ₃ avaliados em sementes de azevém com seus respectivos controle. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	113
Figura 28- Percentagem das variáveis do teste de germinação (A) concentração hormonal (B) das sementes de azevém avaliado nos tempos zero, 15, 30, 60 e 120 dias após coleta da planta-mãe. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	114
Figura 29- Teste de germinação em sementes dormentes (A) e não dormentes (B) de azevém em função do uso de promotores da germinação. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	117
Figura 30- População (A), massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e estatura do azevém (B) em função das culturas de supressão. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	118
Figura 31- População (A), massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e estatura das culturas (B) usadas para supressão do azevém. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	120
Figura 32- Banco de sementes de azevém na camada de 0-5cm (A), 5-10cm (B) e 10-20cm (C) em função da utilização de culturas de supressão ao longo do tempo. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	121
Figura 33- População de azevém (A) e trigo (B) em função da aplicação dos herbicidas pré-emergentes aos 56 DAE. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	126
Figura 34- Produtividade (Kg ha ⁻¹) do trigo em função da aplicação de herbicidas pré-emergentes para controle de azevém. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	127
Figura 35- Banco de sementes de azevém na camada de 0-5cm (A), 5-10cm (B) e 10-20cm (C) em função dos manejos pré-semeadura da soja e do milho ao longo do tempo. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	128

Figura 36- População de azevém em função dos manejos pré-semeadura da soja e do milho ao longo do tempo. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	130
Figura 37- Sementes de azevém produzidas planta ⁻¹ após aplicação dos herbicidas paraquat, glufosinato de amônia, iodosulfuron-metil e cletodim para inviabilização de sementes em diferentes estádios reprodutivos. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	133
Figura 38- Efeito dos herbicidas sobre as sementes dormentes não viáveis de azevém após aplicação em estádio de enchimento de grãos. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	137
Figura 39- Ciclo de vida e principais estádios fenológicos de desenvolvimento do azevém diploide BRS Ponteio (A) e tetraploide Winter Star (B) com a duração (dias após semeadura) e meses de ocorrência no campo. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	146
Figura 40- Estatura de plantas (A) e número de afilhos (B) em genótipos de azevém avaliado até 150 dias após a emergência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	149
Figura 41- Área foliar (A) e MMSPA (B) em genótipos de azevém avaliado até 150 dias após a emergência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	150
Figura 42- Massa seca de raízes (A) e massa seca total (B) em genótipos de azevém avaliado até 150 dias após a emergência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	152
Figura 43- Taxa de crescimento absoluto (A) e razão de área foliar (B) em genótipos de azevém avaliado até 150 dias após a emergência. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	153
Figura 44- Produtividade relativa (PR) e total (PRT) para número de afilhos (A), estatura de plantas (B), área foliar (C) e MMSPA (D) do azevém tetraploide (Winter Star) e diploide (BRS Ponteio) submetidos a série de substituição. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	156

Lista de Tabelas

- Tabela 1-** Biótipos de azevém oriundos do Estado do Rio Grande do Sul para screening e que sobreviveram no campo após aplicação do herbicida glifosato. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.....32
- Tabela 2-** Genes candidatos a referência para normalização da RT-qPCR em azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) ao herbicida glifosato. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.40
- Tabela 3-** Genes alvos para RT-qPCR em azevém suscetível e resistente ao glifosato. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.....41
- Tabela 4-** Valores de C_{50} e GR_{50} com o intervalo de confiança (IC 95%) e fator de resistência (RF) de biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) submetidos a diferentes doses do herbicida glifosato, aos 28 dias após a aplicação (DAA). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019. 44
- Tabela 5-** Resultados da montagem *de novo* transcriptoma dos biótipos de azevém resistente e suscetível ao glifosato. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.45
- Tabela 6-** DEGs relacionadas ao local alvo e não local alvo de ação após análise de transcriptoma em biótipos de azevém suscetível e resistente em resposta ao glifosato na dose de 2160 g e.a. ha^{-1} . FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.55
- Tabela 7-** Valores de I_{50} com o intervalo de confiança (IC de 95%) e fator de resistência (FR) de biótipos de azevém suscetível e resistente submetidos a diferentes doses do glifosato. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.80

Tabela 8- Controle (%) aos 14 e 28 dias após aplicação (DAA) e massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA em gramas planta ⁻¹) de biótipos azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) submetidos à aplicação de herbicida glifosato isolado ou antecedido em trinta minutos da aplicação dos inibidores do citocromo P ₄₅₀ monooxigenase (malathion e PBO) e testemunha sem aplicação. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019....	82
Tabela 9- Sequência parcial do gene EPSPs dos biótipos de <i>L. multiflorum</i> Lam. suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) ao herbicida glifosato. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	84
Tabela 10- Herbicidas pré-emergentes avaliados para controle de azevém na cultura do trigo. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	103
Tabela 11- Características dos compostos analisados em amostras de azevém. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	113
Tabela 12- Fitotoxicidade dos herbicidas pré-emergentes aplicados na cultura do trigo para controle de azevém. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	123
Tabela 13- Controle (%) de azevém com herbicidas pré-emergentes aplicados na cultura do trigo. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	124
Tabela 14- Controle (%) de azevém aos sete, 14 e 28 dias após aplicação (DAA) de paraquat, glufosinato de amônia, iodosulfuron-metil e cletodim para inviabilização das sementes em diferentes estádios reprodutivos. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	132
Tabela 15- Germinação e sementes mortas de azevém após aplicação de paraquat, glufosinato de amônia, iodosulfuron-metil e cletodim para inviabilização das sementes em diferentes estágios reprodutivos. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	134
Tabela 16- Plântulas anormais de azevém após aplicação de paraquat, glufosinato de amônia, iodosulfuron-metil e cletodim para inviabilização das sementes em diferentes estágios reprodutivos. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	135
Tabela 17- Sementes viáveis e não-viáveis de azevém após aplicação de paraquat, glufosinato de amônia, iodosulfuron-metil e cletodim para inviabilização das sementes em diferentes estádios reprodutivos. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	136

Tabela 18- Componentes de produtividade do azevém diploide (BRS Ponteio) e tetraploide (INIA Winter Star) ao final do ciclo de vida. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.....	154
Tabela 19- Diferenças relativas de produtividade (PR) e produtividade relativa total (PRT) para as variáveis número de afilhos planta ⁻¹ , estatura de plantas, área foliar e massa da matéria seca da parte aérea, nas proporções de plantas de azevém tetraploide (INIA Winter Star) e azevém diploide (BRS ponteio). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.....	157
Tabela 20- Respostas para número de afilhos planta ⁻¹ , estatura de plantas, área foliar e massa da matéria seca da parte aérea do azevém diploide (BRS Ponteio) competindo com azevém tetraploide (Winter Star) sob diferentes proporções de plantas. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	158
Tabela 21- Índices de competitividade de azevém tetraploide (Winter Star) competindo com azevém diploide (BRS Ponteio) expressos através da competitividade relativa (CR), coeficientes de agrupamento relativo (Ka e Kb) e competitividade (C). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.	159

Sumário

1. INTRODUÇÃO	24
2. CAPÍTULO I – Screening inicial, análise de transcriptoma e expressão gênica em biótipos de <i>Lolium multiflorum</i> Lam. suscetível e resistente ao glifosato do Estado do Rio Grande do Sul.....	28
2.1 Introdução	28
2.2 Materiais e métodos.....	31
2.2.1 Screening e curva dose-resposta para o herbicida glifosato em azevém.....	31
2.2.2 Análise de transcriptoma em biótipos de azevém suscetível e resistente ao glifosato.....	34
2.2.2.1 Material vegetal e extração do RNA.....	34
2.2.2.2 Construção das bibliotecas de cDNA e sequenciamento em plataforma Illumina.....	35
2.2.2.3 Montagem <i>de novo</i> transcriptoma e anotação funcional dos transcritos.....	36
2.2.2.4 Expressão gênica diferencial (DEGs) e genes candidatos em resposta ao glifosato.....	37
2.2.2.5 Acesso aos dados do RNA-Seq os biótipos de azevém.	39
2.2.3 RT-qPCR dos genes candidatos em resposta ao glifosato.....	39
2.2.3.1 Síntese do cDNA dos biótipos de azevém.....	40
2.2.3.2 Genes candidatos a referência e condições para RT-qPCR.	40
2.2.3.3 Eficiência e análise da estabilidade dos genes candidatos a referência.....	42
2.3 Resultados e discussão	43

2.3.1 Screening e curva dose-resposta dos biótipos de azevém ao glifosato.....	43
2.3.2 Sequenciamento do transcriptoma e montagem <i>de novo</i>	45
2.3.3 Anotação funcional das montagens pelo gene ontology e KEGG. ...	46
2.3.4 Identificação e anotação das DEGs.	49
2.3.5 RT-qPCR dos genes candidatos em resposta ao glifosato.....	59
2.4 Conclusões.....	67
3. CAPÍTULO II – Análise de transcriptoma em biótipos de <i>Lolium multiflorum</i> Lam. e o mecanismo de resistência ao glifosato.....	68
3.1 Introdução	68
3.2 Material e métodos.....	71
3.2.1 Bioensaio <i>in vivo</i> para quantificação do ácido chiquímico	72
3.2.2 Metabolismo do herbicida glifosato com inibidores da citocromo P ₄₅₀	73
3.2.3 Superexpressão e sequenciamento do gene EPSPs.....	74
3.2.4 Atividade de enzimas antioxidantes.....	75
3.3 Resultados e discussão	77
3.3.1 Bioensaio <i>in vivo</i> para quantificação do ácido chiquímico.	78
3.3.2 Metabolismo do herbicida glifosato com inibidores da citocromo P ₄₅₀	81
3.3.3 Superexpressão e sequenciamento do gene EPSPs.....	83
3.3.4 Atividade das enzimas antioxidantes.....	86
3.4 Conclusões	91
4. CAPÍTULO III – Práticas de manejo para supressão e redução do banco de sementes de <i>Lolium multiflorum</i> Lam. resistente ao herbicida glifosato.....	92
4.1 Introdução	92
4.2 Material e métodos.....	95
4.2.1 Longevidade das sementes de <i>Lolium multiflorum</i> Lam. submetidas a diferentes profundidades de enterrio.	96
4.2.2 Germinação e quantificação temporal dos hormônios da dormência em sementes de <i>Lolium multiflorum</i> Lam.....	97
4.2.3 Germinação de sementes dormentes de <i>Lolium multiflorum</i> Lam. com nitratos e reguladores endógenos.	99

4.2.4	Potencial supressor das culturas de inverno sobre o azevém em áreas agrícolas do Sul do Brasil.....	100
4.2.5	Herbicidas pré-emergentes na cultura do trigo para manejo de <i>Lolium multiflorum</i> Lam. resistente ao glifosato.....	102
4.2.6	Manejo do banco de sementes de azevém através de métodos físicos e mecânicos na pré-semeadura das culturas de verão.....	104
4.2.7	Inviabilização de sementes de <i>Lolium multiflorum</i> Lam. com herbicidas em diferentes estádios no período reprodutivo.....	105
4.3	Resultados e discussão	107
4.3.1	Longevidade das sementes de <i>Lolium multiflorum</i> Lam. submetidas a diferentes profundidades de enterrio ao longo do tempo.....	107
4.3.2	Germinação e quantificação dos hormônios da dormência em sementes de <i>Lolium multiflorum</i> Lam no tempo.....	113
4.3.3	Germinação de sementes dormentes de <i>Lolium multiflorum</i> Lam. com nitratos e reguladores endógenos.	116
4.3.4	Potencial supressor das culturas de inverno sobre o azevém em áreas agrícolas do Sul do Brasil.....	118
4.3.5	Herbicidas pré-emergentes na cultura do trigo para manejo de <i>Lolium multiflorum</i> Lam. resistente ao glifosato.....	123
4.3.6	Manejo do banco de sementes de azevém através de métodos físicos e mecânicos na pré-semeadura das culturas de verão.....	127
4.3.7	Inviabilização de sementes de <i>Lolium multiflorum</i> Lam. com herbicidas em diferentes estádios do período reprodutivo.....	131
4.4	Conclusões	137
5.	CAPÍTULO IV – Adaptabilidade e habilidade competitiva de <i>Lolium multiflorum</i> Lam. diploide e tetraploide para manejo da resistência.....	139
5.1	Introdução	139
5.2	Material e métodos.....	141
5.2.1	Ciclo e duração dos principais estágios fenológicos de <i>Lolium multiflorum</i> Lam. diploide e tetraploide.	142
5.2.2	Valor adaptativo de <i>Lolium multiflorum</i> Lam. diploide e tetraploide para manejo da resistência.....	142

5.2.3 Habilidade competitiva de <i>Lolium multiflorum</i> Lam. diploide e tetraploide em sistemas agrícolas.	144
5.3 Resultados e discussão	146
5.3.1 Ciclo e duração dos principais estágios fenológicos de <i>Lolium multiflorum</i> Lam. diploide e tetraploide.	146
5.3.2 Valor adaptativo de <i>Lolium multiflorum</i> Lam. diploide e tetraploide para manejo da resistência.	148
5.3.3 Habilidade competitiva de <i>Lolium multiflorum</i> Lam. diploide e tetraploide em sistemas agrícolas.	155
5.4 Conclusões	160
6. CONCLUSÕES GERAIS	161
REFERÊNCIAS.....	163
VITA	189

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de alimentos do mundo com 237,3 milhões de toneladas de grãos produzidas em mais de 62 milhões de hectares (FAO, 2019). Na região Sul do Brasil, a maior parte das áreas destinadas à produção são manejadas sob sistema de semeadura direta com cultivo de soja e milho no verão e na safrinha, seguidas do cultivo do trigo ou espécies de cobertura de solo durante o inverno como culturas sucessoras (SILVA et al., 2006).

O azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) é uma espécie forrageira de inverno amplamente utilizada como planta de cobertura de solo em sistemas agrícolas do Sul do país (KISSMANN; GROTH, 2007), completando seu ciclo antes da colheita dos cereais de inverno e realimentando os bancos de sementes do solo (MAIA et al., 2009). Entretanto, a ocorrência da espécie em cultivos de inverno como trigo e cevada é considerada prejudicial ao desenvolvimento devido os efeitos da competição, causando redução da produtividade e na qualidade dos grãos colhidos (RIGOLI et al., 2008; TIRONI et al., 2014).

O controle químico com herbicidas é um método altamente eficaz e de baixo custo comparado a outras estratégias para manejo de plantas daninhas, protegendo o potencial produtivo das culturas (BUSI et al., 2013). No trigo, a dessecação do azevém e de outras plantas daninhas com glifosato é considerada uma etapa importante do manejo pois permite a semeadura em área limpa, proporcionando vantagem competitiva a cultura e melhor manejo em pós-emergência.

Em plantas suscetíveis, o glifosato inibe a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) causando acúmulo de chiquimato, um intermediário da biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano e, precursores de metabólitos secundários importantes no crescimento e desenvolvimento de plantas (DUKE, 2018). Todavia, a pressão de seleção devido

uso intenso e repetitivo do glifosato favoreceu o surgimento de biótipos de azevém resistentes em diversas áreas de cultivo.

A resistência de plantas daninhas a herbicidas caracteriza-se pela capacidade herdável de alguns biótipos dentro de uma mesma população em sobreviver e reproduzir após expostas a dose herbicida, geralmente letal para a maioria dos indivíduos (AGOSTINETTO; VARGAS, 2014). Além disso, a evolução da resistência ocasiona aumento dos custos para controle e dificulta o manejo, especialmente para culturas onde o número de moléculas existentes para manejo na pós-emergência é limitado (POWLES, YU, 2010; KAUNDUN et al., 2013).

O primeiro caso de resistência para biótipos de azevém a herbicidas inibidores da enzima EPSPs ocorreu no ano de 2004 em pomares de maçã do Rio Grande do Sul, após frequentes aplicações de glifosato (ROMAN et al., 2004). Atualmente, a resistência do azevém a herbicidas também é reportada para os inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) (MARIANI, 2015), enzima acetil-CoA carboxilase (ACCase) (VARGAS et al., 2013) e, ocorrência de casos com resistência múltipla a herbicidas inibidores da EPSPs e ALS (HENCKES et al., 2019). Aliado aos problemas da resistência, a ocorrência do azevém coincide com os cultivos de inverno, dificultando o controle devido à similaridade botânica e o baixo número de moléculas herbicidas eficientes para controle e seletivas as culturas de inverno.

A elaboração de estratégias de manejo e prevenção da resistência dependem, primeiramente da investigação dos mecanismos envolvidos na sobrevivência dos biótipos, geralmente mais problemáticos para espécies de fecundação cruzada onde os níveis de resistência podem ser elevados dentro de algumas gerações (YU; POWLES, 2014). Em plantas daninhas resistentes, o aumento da expressão gênica em resposta ao herbicida pode ser considerado a base do mecanismo de resistência, especialmente quando técnicas moleculares de alto rendimento são utilizadas para proporcionar uma abordagem ampla sobre os processos fisiológicos e moleculares envolvidos (YUAN et al., 2007; MAROLI et al., 2018a)

Recentemente, a análise de transcriptoma tem sido considerada uma ferramenta inovadora e pouco utilizada na caracterização gênica de plantas daninhas resistentes a herbicidas, permitindo a determinação do *splicing* alternativo e das redes reguladoras, expressão de alelos específicos com localização precisa dos limites da transcrição e no desenvolvimento de marcadores, importantes no

manejo da resistência (RAMSKOLD; KAVAK; SANDBERG, 2012; GIACOMINI et al., 2018).

Os problemas crescentes de resistência do azevém a herbicidas em culturas agrícolas implica em mudanças quanto as estratégias de manejo químico, visando redução da interferência e dos bancos de sementes do solo (WALSH et al., 2011; BOUTSALIS; GILL; PRESTON, 2014). Entretanto, a evolução da resistência de plantas daninhas a herbicidas é um processo dinâmico que acarreta em aumento no número de indivíduos ao longo do tempo, devendo ser manejada para evitar a evolução da resistência e diminuir seu impacto à agricultura.

O amplo entendimento dos processos envolvidos na resistência de biótipos a herbicidas permite a busca por alternativas de manejo visando criar um ambiente desfavorável para o desenvolvimento de plantas daninhas e contribuir para redução dos bancos de sementes (BURGOS; TRANEL; STREIBIG, 2013; SHANER; BECKIE, 2014). As principais práticas agronômicas alternativas para manejo de plantas daninhas incluem o uso da rotação de culturas, manejo do solo, uso de culturas competitivas e/ou supressoras, coleta e destruição de sementes (HARKER, 2013).

No campo, a presença e capacidade de interferência das plantas daninhas em áreas de cultivo está relacionada com a dinâmica populacional dos bancos de sementes e ao grau de dormência, características intrínsecas de cada espécie que impedem o estabelecimento sob condições inadequadas e permitem diferentes fluxos de germinação (GRAEBER et al., 2012; NÉE; XIANG; SOPPE, 2017). Para plantas daninhas, a exposição das sementes a condições favoráveis de germinação, geralmente coincide com a semeadura das culturas onde a ocorrência de fluxos descontínuos de germinação dificulta o controle.

O uso de culturas supressoras de rápido crescimento inicial e o manejo com herbicidas alternativos são alternativas que podem auxiliar significativamente na redução dos bancos de semente e na evolução da resistência (MIRSKY et al., 2010; COLLAVO; STREK; BEFFA, 2013). Estudos realizados na Austrália com populações de *Lolium rigidum* Gaudin. resistente ao herbicida glifosato evidenciaram que a eliminação da entrada de sementes pode esgotar o banco de sementes em período inferior a 24 meses (NARWAL; SINDEL, JESSOP, 2008). Práticas eficientes para manejo da resistência e redução dos bancos de sementes devem evitar a permanência de áreas sob pousio na entressafra, preconizando o uso de culturas na estação fria ou plantas de cobertura do solo (MAIA et al., 2008).

De maneira similar, outras práticas do manejo integrado como o método físico e mecânico aliado ao uso da rotação de culturas podem auxiliar na redução da interferência do azevém e contribuir significativamente na redução da realimentação dos bancos de semente (MIRSKY et al., 2010; HARKER; O'DONOVAN, 2013). O manejo integrado da rotação de culturas e controle químico para biótipos resistentes causou redução do banco de sementes do solo, mesmo quando utilizados por períodos curtos (KLEEMANN; PRESTON; GILL, 2016). Outra alternativa importante de manejo consiste na inviabilização das sementes de plantas daninhas resistentes com herbicidas aplicados na pré-colheita do trigo, possibilitando redução da qualidade fisiológica e aumento de sementes mortas (CAMPOS et al., 2012).

Para plantas daninhas, a adaptação evolutiva de alguns indivíduos dentro de uma população em resposta a aplicação de herbicidas são fatores que devem ser considerados quando se busca eficiência dos sistemas agrícolas. Estudos de adaptabilidade ou “*fitness*” de uma espécie são importantes para entender o comportamento dos componentes de crescimento, sobrevivência e produção de sementes viáveis das espécies, em função do aproveitamento dos recursos de crescimento em determinado nicho ecológico (RADOSEVICH; HOLT; GHERSA, 2007). O uso crescente de azevém tetraploide na região Sul do Brasil, especialmente como planta forrageira, pode ser considerada uma alternativa para substituição do azevém diploide resistente a herbicidas. Entre as principais vantagens evidenciadas para o azevém tetraploide, destaca-se a maior produção de massa seca e melhor qualidade forrageira (NAIR, 2004; GILLILAND; JOHNSTON; CONNOLLY, 2007) sugerindo ser uma espécie capaz de substituir o azevém diploide com vantagens ao produtor e aos sistemas agrícolas. Além da adaptabilidade, a habilidade competitiva do azevém tetraploide com diploide através de experimentos em série de substituição necessita ser avaliada para elucidar as relações de competição inter e intraespecífica e, avaliar seu estabelecimento dentro dos sistemas de cultivo.

Os objetivos do trabalho foram elucidar o mecanismo de resistência em biótipos de azevém através da análise de transcriptoma e quantificar a expressão relativa de genes candidatos em resposta ao glifosato; avaliar um conjunto de práticas de manejo para redução da população infestante e do banco de sementes do solo e, analisar o ciclo de vida, adaptabilidade e habilidade competitiva do azevém tetraploide em substituição ao diploide.

2. CAPÍTULO I – Screening inicial, análise de transcriptoma e expressão gênica em biótipos de *Lolium multiflorum* Lam. suscetível e resistente ao glifosato do Estado do Rio Grande do Sul.

2.1 Introdução

As plantas daninhas são consideradas agentes do estresse causadoras de diversos problemas para a produção agrícola, interferindo negativamente na produtividade e causando danos econômicos. O azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) é uma planta daninha anual de inverno encontrada em lavouras de trigo e cevada do Sul do Brasil, podendo causar redução da produtividade superior a 60%, devido a elevada capacidade de interferência (BARARPOUR et al., 2018). Além disso, é uma espécie forrageira amplamente usada para alimentação de bovinos e usada como planta de cobertura de solo para o sistema de plantio direto (VARGAS et al., 2005; PRESTON et al., 2009).

O manejo químico com herbicidas é considerado o principal método de controle utilizado pelos agricultores por ser eficiente e ter baixo custo quando comparado a outras práticas de manejo (BUSI et al., 2013). O glifosato, após a sua introdução no mercado agrícola em 1970, tornou-se o herbicida mais utilizado no mundo para o controle de plantas daninhas e, tem sido amplamente utilizado para manejo do azevém e outras espécies infestantes durante a dessecação, permitindo a semeadura em áreas sem a presença de plantas daninhas.

Em plantas suscetíveis, o glifosato é um herbicida sistêmico que inibe a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) causando acúmulo de chiquimato, um substrato chave da rota do ácido chiquímico responsável pela biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano e, precursores de metabólitos secundários importantes no crescimento e

desenvolvimento de plantas (TZIN; GALILI, 2010). Após a inibição da enzima EPSPs, diversos processos fisiológicos de plantas suscetíveis são afetados com diminuição significativa da síntese proteica, inibição do crescimento, redução no transporte de fotoassimilados e na fixação de CO₂ fotossintético (YANNICCARI et al., 2012a), limitados ou ausentes em plantas daninhas resistentes ao herbicida.

No Brasil, a ocorrência de falhas de controle tem aumentado significativamente após uso repetido do glifosato por vários anos na mesma área, com diversas populações de azevém resistentes ao glifosato identificadas em resposta a pressão de seleção. A resistência consiste na habilidade herdável de uma planta sobreviver e reproduzir-se após exposição a uma dose herbicida normalmente letal (dose máxima de bula) aos demais indivíduos da mesma população (AGOSTINETTO; VARGAS, 2014). O primeiro relato de resistência ao herbicida glifosato no Brasil ocorreu no ano de 2004 para biótipos de azevém coletados em pomares de maçã que sobreviveram após aplicação do herbicida glifosato na dose de 5760 g e.a. ha⁻¹ (ROMAN et al., 2004). Além disso, os problemas de resistência no Brasil e no mundo se intensificaram após a introdução de soja e milho Roundup Ready[®] em virtude do aumento expressivo no uso do herbicida glifosato, com intervalos menores entre aplicações e em doses superiores daquelas indicadas em bula, contribuindo fortemente para a evolução da resistência (VARGAS et al., 2011).

No campo, a evolução da resistência de plantas daninhas a herbicidas é um processo dinâmico e dependente do conjunto de fatores que podem ser manejados a fim de diminuir seu impacto negativo à agricultura. Na fase inicial, a resistência de plantas daninhas causa alterações na dinâmica de populações com aumento de densidade ao longo do tempo e dose necessária para controle, podendo ser avaliada de forma científica através dos estudos de curva-dose resposta. A resposta biológica dos biótipos em função da dose herbicida pode ser representada por modelos não lineares do tipo log-logístico (SEEFELDT; JENSEN; FUERST, 1995), que permitem estimar os valores de C₅₀ (dose necessária para controle de 50%) e/ou GR₅₀ (dose para reduzir 50% a matéria seca da parte aérea), usados posteriormente na determinação do fator de resistência (FR) dos biótipos (HALL; STROMME; HORSMAN, 1998; CHRISTOFFOLETI, 2002). Todavia, as respostas ao herbicida podem ser variáveis entre biótipos e o aumento significativo da dose para

controle de azevém resistente pode inviabilizar a sua utilização dentro dos programas de manejo e tornar o controle mais oneroso.

A resistência a herbicidas como um resultado da adaptação evolutiva das plantas daninhas pode ocorrer devido a diferentes mecanismos envolvendo o local alvo ou não local alvo de ação do herbicida (YUAN et al., 2007; DÉYLE et al., 2013). Os mecanismos de resistência para o local alvo de ação dos herbicidas inibidores da EPSPs incluem alterações do gene da enzima alvo que impede a ligação do herbicida, devido a alterações nucleotídicas, ou ainda, podem estar associados ao aumento do número de cópias do gene (SALAS et al., 2012; SAMMONS; GAINES, 2014). Todavia, a absorção e translocação diferencial, sequestro vacuolar ou nos cloroplastos, metabolismo diferencial com rápida degradação do herbicida, ou ainda, aumento da atividade antioxidante envolvidos na proteção contra o dano oxidativo são os principais mecanismos de resistência de plantas daninhas a herbicidas referentes ao não local alvo de ação (DÉYLE; JASIENIUK; LE CORRE, 2013).

Em plantas daninhas, diversas respostas do estresse herbicida envolvem a regulação diferencial da expressão gênica, garantindo sua sobrevivência e desenvolvimento (LIANG; LU; YANG, 2012; FANG et al., 2015). Os herbicidas desencadeiam mudanças fisiológicas e metabólicas em nível pós-transcricional como resposta compensatória à inibição, promovendo redução ou ausência de afinidade com o local alvo de ação (DÉYLE, 2013). Recentemente, a análise de transcriptoma (RNA-Seq) tem sido considerada um dos métodos mais avançados para investigação da resistência a herbicidas, proporcionando elevada eficácia em fornecer informações do transcriptoma, detectar variação genética, *splicing* alternativo, expressão de alelos específicos e redes regulatórias, especialmente para espécies sem um genoma sequenciado ou com informações limitadas, permitindo a localização precisa dos limites da transcrição com resolução base a base (PENG et al., 2010; MAROLI et al., 2018a).

As tecnologias de sequenciamento de próxima geração da Illumina (Sistema HiSeq₂₅₀₀) consiste na amplificação de uma única molécula com sequenciamento reversível baseado em um terminador para gerar o transcriptoma de referência *de novo* através de leituras curtas dos pares de bases (pb), proporcionando ampla cobertura e alta sensibilidade na detecção de transcritos (PENG et al., 2010; MUTZ et al., 2013). Resultados reportaram que o aumento da expressão gênica pode ser a base dos mecanismos de resistência onde a utilização de métodos experimentais

baseados na análise de RNA-Seq podem fornecer informações essenciais para comparar as respostas de plantas submetidas a herbicidas (MAROLI et al., 2018a).

As respostas em nível pós-transcricional de plantas daninhas submetidas a herbicidas para o mecanismo de resistência envolvendo o não local alvo de ação envolvem a expressão diferencial de alguns genes candidatos como ABC transportadores, glutathione S-transferases, glicosiltransferases, citocromos P₄₅₀, hidrolases e peroxidases, que possuem papel importante na resistência de plantas daninhas a herbicidas (YUAN et al., 2007; GAINES et al., 2014, SALAS-PEREZ et al., 2018). Todavia, a investigação do mecanismo de resistência através de RNA-Seq requer a validação dos genes candidatos e a quantificação da expressão gênica diferencial em resposta ao estresse herbicida (GIACOMINI et al., 2018). Juntamente com o microarranjos de cDNA, a reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) é uma técnica frequentemente usada na quantificação de RNA, proporcionando elevada acurácia bem como alta sensibilidade e especificidade para uma gama ampla de genes (CALDANA et al., 2007).

A quantificação da expressão diferencial através de RT-qPCR requer o uso de genes de referência para minimizar as influências de RNA e a eficiência da transcrição reversa (BUSTIN, 2002; MA et al., 2013). Todavia, os genes de referência devem ser estáveis sob diferentes condições ambientais (MA et al., 2013). Dessa forma, os resultados da análise de RNA-Seq e a validação através de RT-qPCR são importantes para avaliar a resposta diferencial e os mecanismos de resistência de plantas daninhas ao glifosato, possibilitando abordagens em nível molecular e o primeiro passo para o uso do RNA de interferência (RNAi). O objetivo deste estudo foi avaliar a resistência e suscetibilidade de biótipos de azevém ao glifosato bem como realizar a análise de transcriptoma e a quantificação da expressão gênica de biótipos após a exposição ou não do glifosato para determinar o mecanismo de resistência.

2.2 Materiais e métodos

A metodologia dos estudos está descrita na sequência para facilitar a leitura.

2.2.1 *Screening* e curva dose-resposta para o herbicida glifosato em azevém.

Para a realização do trabalho, as sementes de 43 biótipos de azevém foram coletadas em diversas áreas cultivadas com trigo e cevada do Estado do Rio Grande do Sul que apresentavam histórico de aplicações do herbicida glifosato (Tabela 1).

Tabela 1- Biótipos de azevém oriundos do Estado do Rio Grande do Sul para screening e que sobreviveram no campo após aplicação do herbicida glifosato. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019.

Amostra	Biótipos*	Município	Latitude	Longitude
1	TUP 04	Tuparendi	27°45'26" S	54°34'27" W
2	DP 01	Dom Pedrito	30°58'54" S	54°40'34" W
3	SVA 01	São Valentim	27°50'50" S	54°18'18" W
4	SVA 02	São Valentim	27°50'50" S	54°18'18" W
5	SVA 04	São Valentim	27°50'50" S	54°18'18" W
6	SVA 03	São Valentim	27°50'50" S	54°18'18" W
7	SVA 05	São Valentim	27°50'50" S	54°18'18" W
8	SJO 02	São Jorge	28°28'13" S	51°45'10" W
9	ENV 02	Engenho Velho	28°13'13" S	52°20'39" W
10	CDO 04	Cacique Doble	27°47'28" S	51°39'28" W
11	VGR 09	Victor Graeff	28°35'45" S	52°41'34" W
12	AIA 60	Alto Alegre	28°12'00" S	53°39'44" W
13	AGS 61	Água Santa	28°10'48" S	52°03'79" W
14	SPM 93	São Paulo Missões	28°10'77" S	52°22'98" W
15	TUC 92	Tucunduva	27°33'42" S	54°27'48" W
16	JOI 01	Joia	28°38'51" S	54°07'21" W
17	COL 01	Colorado	28°28'55" S	53°01'13" W
18	EMB 04	Passo Fundo	28°10'45" S	52°23'79" W
19	EMB 05	Passo Fundo	28°10'77" S	52°22'98" W
20	VGR 15	Victor Graeff	28°36'48" S	52°44'19" W
21	VGR 16	Victor Graeff	28°34'43" S	52°44'03" W
22	VAC 48	Vacaria	28°52'05" S	50°93'20" W
23	SJA 60	Salto do Jacuí	29°13'54" S	53°21'75" W
24	SJA 61	Salto do Jacuí	29°13'68" S	53°20'90" W
25	EMB 11	Passo Fundo	28°13'45" S	52°25'79" W
26	EMB 12	Passo Fundo	28°13'77" S	52°24'98" W
27	EMB 13	Passo Fundo	28°13'85" S	52°24'04" W
28	EMB 14	Passo Fundo	28°14'49" S	52°23'50" W
29	COQ	Coqueiros do Sul	28°11'02" S	52°45'23" W
30	COQ 02	Coqueiros do Sul	28°11'24" S	52°44'32" W
31	VIF 01	Vila Floresta-Ijuí	28°20'17" S	53°49'42" W
32	VIF 02	Vila Floresta-Ijuí	28°20'21" S	53°49'37" W
33	VIF 03	Vila Floresta-Ijuí	28°18'45" S	53°50'16" W
34	VIF 04	Vila Floresta-Ijuí	28°19'19" S	53°50'44" W
35	COQ 03	Coqueiros do Sul	28°10'12" S	52°40'49" W
36	COQ 04	Coqueiros do Sul	28°11'11" S	52°44'23" W
37	ALM 01	Almirante do Sul	28°15'02" S	52°51'09" W
38	CCGL01	Cruz Alta	28°36'19" S	53°40'53" W
39	CCGL02	Cruz Alta	28°36'28" S	53°40'04" W
40	CCGL03	Cruz Alta	28°36'16" S	53°40'50" W
41	CCGL06	Cruz Alta	28°36'15" S	53°40'49" W
42	CONV01	Passo Fundo	27°57'42" S	52°10'73" W
43	PDIR 01	Passo Fundo	27°57'85" S	52°11'29" W

*Dois biótipos foram selecionados para a curva dose-resposta em função da resistência e suscetibilidade ao herbicida glifosato, escolhendo-se biótipos do mesmo município.

Em cada área visitada, amostras de sementes obtidas de uma única planta com suspeita de resistência foi coletada, sendo posteriormente identificada e georreferenciada através das coordenadas geodésicas, utilizando o equipamento de GPS (*Global Positioning System*). As principais práticas de manejo adotadas pelos produtores nessas áreas suspeitas envolviam a ausência de rotação de culturas e mecanismo de ação, aplicações de três a quatro vezes na mesma área e em estágio inadequado, uso de doses acima de 1440 g e.a. ha⁻¹ na dessecação para semeadura de soja e/ou de trigo e doses superiores a 960 g e.a. ha⁻¹ para manejo em pós-emergência da soja Roundup Ready. Após as coletas, as sementes foram limpas e armazenadas até a implantação dos ensaios.

O *screening* foi conduzido em casa de vegetação (Capão do Leão - 31°80'S, 52°41'W) em delineamento experimental completamente casualizado, com quatro repetições. As sementes coletadas foram semeadas em bandejas para obtenção das plantas usadas no estudo. As bandejas foram preenchidas com solo classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo e substrato GerminaPlant® na proporção 2:1. A análise do solo evidenciou pH em água= 5,6; CTC_{pH7}= 7,2 cmol_c dm⁻³; matéria orgânica= 1,5%; argila= 16%; textura = 4; Ca= 4,1 cmol_c dm⁻³; Mg= 1,1 cmol_c dm⁻³; Al= 1,8 cmol_c dm⁻³; P= 6,5 mg dm⁻³ e K= 0,15 cmol_c dm⁻³. A correção da fertilidade foi realizada previamente a mistura com o substrato GerminaPlant®, conforme as recomendações para a cultura do trigo (SBCS, 2016).

As plantas, quando atingiram estágio de 3-4 folhas, foram submetidas a aplicação de 2160 g e.a. ha⁻¹ de glifosato (Roundup Original 360 SL, Monsanto-Brasil), máxima dose de registro encontrada (AGROFIT, 2018). O herbicida foi aplicado com pulverizador costal pressurizado a CO₂, equipado com pontas de pulverização do tipo leque 110.02, espaçadas 50 cm entre si e calibrado para um volume de calda de 120 L ha⁻¹.

A resposta dos biótipos ao herbicida foi observada 28 dias após aplicação (DAA), adotando-se a escala percentual onde zero (0) correspondeu a ausência de controle e, cem (100) foi a nota atribuída para a morte completa das plantas (FRANS; CROWLEY, 1986). Após *screening*, dois biótipos (SVA02 - suscetível e SVA04 - resistente) oriundos do município de São Valentin-RS (mesma área cultivada com trigo) foram selecionados para o estudo de curva dose-resposta e, usados para a análise de RNA-Seq e expressão gênica.

Os dados obtidos foram analisados quanto a sua homocedasticidade e, posteriormente, submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Ocorrendo significância estatística, os dados foram ajustados ao modelo de regressão não linear do tipo log-logístico utilizando o software SigmaPlot 12.0 (SIGMAPLOT, 2012) e, os valores de C_{50} e GR_{50} , foram calculados a partir dos parâmetros da equação (SEEFELDT; JENSEN; FUERST, 1995) a qual relaciona a resposta da planta (controle) com a dose x do herbicida. Os valores foram ajustados à equação de regressão sigmoidal do tipo logístico.

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

onde: y = percentagem de controle; x = dose do herbicida; e a , x_0 e b são parâmetros da equação onde a consiste na diferença entre os pontos de máxima e mínima da curva, x_0 é a dose que proporciona 50% da resposta variável e, b é a declividade da curva.

O fator de resistência (FR) foi calculado pela razão entre o C_{50} ou GR_{50} do biótipo resistente com o seu correspondente do biótipo suscetível. O intervalo de confiança foi calculado através da estimação do intervalo para a média μ com variância estimada conforme equação:

$$P(\bar{X} - t_{\alpha/2} \sqrt{S^2/n} \leq \mu \leq \bar{X} + t_{\alpha/2} \sqrt{S^2/n} = 1 - \alpha)$$

onde: \bar{X} corresponde ao C_{50} ou GR_{50} , $t_{\alpha/2}$ valor da tabela t de student, S^2 o quadrado médio do erro do x_0 , obtido na regressão não linear e n o número de repetições (STORCK; LOPES; LÚCIO, 2001). A sobreposição do intervalo de confiança entre os biótipos indica não haver diferença significativa entre os valores de C_{50} e/ou GR_{50} dos biótipos (AVILA et al., 2005).

2.2.2 Análise de transcriptoma em biótipos de azevém suscetível e resistente ao glifosato.

A metodologia para análise do transcriptoma está descrita na sequencia para melhor entendimento.

2.2.2.1 Material vegetal e extração do RNA.

Os biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) ao glifosato oriundos do município de São Valentin-RS (27°35'S, 54°28'W) foram clonados vegetativamente através da separação dos afilhos e transplantados em vasos individuais para avaliação. O delineamento experimental para análise do RNA-Seq incluiu três repetições biológicas dos biótipos suscetível e resistente submetidos ou não ao glifosato na dose de 2160 g e.a. ha⁻¹. Amostras foliares de plantas individuais foram colhidas 24 horas após a aplicação, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para análise de RNA-Seq e validação em RT-qPCR.

Para a extração do RNA total foram usadas amostras de 100mg de folhas utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), seguindo as instruções do fabricante com algumas modificações. As folhas jovens foram colhidas e moídas até pó fino usando nitrogênio líquido (N₂), seguido de homogeneização na presença de 1mL de Trizol onde a porção líquida foi centrifugada a 11700rpm por 6min. O sobrenadante foi coletado individualmente e transferido para tubo contendo 150µL de clorofórmio que foi centrifugado a 11700rpm por 15min a 4°C. A fase aquosa (±500µl) foi transferida para um novo tubo contendo 500µL de álcool puro usado para precipitar o RNA, seguido de repouso à temperatura ambiente.

A amostra foi novamente centrifugada a 11700rpm por 15min a 4°C para formação do pellet, seguido de agitação rápida em vortex. O sedimento de RNA foi cuidadosamente decantado do sobrenadante e imediatamente lavado em solução fria de álcool a 75%, seguido de centrifugação a 7500rpm por 5min a 4°C e redissolvido em 20µL de água DEPC. A quantidade e qualidade das amostras de RNA foram avaliadas em gel de agarose a 2% e em espectrofotômetro (Nanovue Plus 1000) antes do sequenciamento na plataforma Illumina (Hi-Seq₂₅₀₀ System).

2.2.2.2 Construção das bibliotecas de cDNA e sequenciamento em plataforma Illumina.

A preparação das bibliotecas de cDNA e o sequenciamento em Illumina foram realizados no Laboratório de Genômica Funcional Aplicada à Agricultura e Agroenergia da Universidade de São Paulo (USP), localizada em Piracicaba-SP. Previamente, os valores de RIN (*RNA integrity number*) e a concentração de cada amostra foram examinados em Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, EUA). Uma biblioteca de cDNA de referência foi construída usando 500ng de

amostras do RNA total e, o mRNA foi enriquecido e purificado de acordo com o Kit de Preparação de Amostra de mRNA Illumina TruSeq Stranded (Illumina, San Diego, CA), seguindo o protocolo Low Throughput (LT) do fabricante para quebrar em fragmentos curtos.

A primeira cadeia de cDNA foi sintetizada pela adição da transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen), seguida de incubação por ciclo térmico a 25°C por 10min, 42°C por 15min e 70°C por 15min. O cDNA plate (CDP) barcode foi removido e a síntese da segunda cadeia foi processada pela master mix a 16°C por 60min. Após isso, o reparo final foi realizado para remover desvios da fita 3' para ligar os adaptadores de sequências nas extremidades 5'→3' de cada fita do fragmento genômico, importante na amplificação da biblioteca durante a formação do *cluster*.

Os fragmentos de DNA foram enriquecidos em termociclador pré-aquecido usando um ciclo a 98°C por 30s, 15 ciclos a 98°C por 10s, 60°C por 30s e 72°C por 30sec, seguido de um ciclo a 72°C por 5min. Finalmente, as doze bibliotecas foram sequenciadas em placa com detector de fluorescência do tipo HiSeq Flow Cell V₄, usando o kit HiSeq SBS V₄ que proporcionou leituras com comprimento aproximado de 100 pares de bases (pb) após submetidas a leituras duplas.

2.2.2.3 Montagem *de novo* transcriptoma e anotação funcional dos transcritos.

Os dados brutos gerados foram pré-processados para remover sequências sem sentido geralmente oriundas de contaminação dos adaptadores, nucleotídeos desconhecidos maiores que 5% e leituras de baixa qualidade (sequências ambíguas 'N' ou muito curtas) usando a ferramenta Fastqscreen (WINGET; ANDREWS, 2018), seguido de verificação quanto a qualidade das sequências em FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/>). Todas as leituras foram submetidas ao pré-processamento para corte e filtragem da qualidade (**Opção:** LEADING:3, TRAILING:3, SLIDINGWINDOW:4:15) e, para remover as sequências dos adaptadores (**Opção:** ILLUMINACLIP 2:40:15) usando o programa Trimmomatic (BOLGER et al., 2014), visando reconstruir um transcriptoma completo.

As leituras limpas para a montagem *de novo* transcriptoma foram realizadas pelo programa Trinity (GRABHERR et al., 2011; HAAS et al., 2013) que implementa um algoritmo gráfico de Bruijn, usando as configurações padrões, exceto para o valor K-mer (K-mer=25) e, descarte de transcritos menores que 300pb para

montagem. A montagem do transcriptoma foi realizada para todas as doze bibliotecas usando todos os dados das sequências fragmentadas, considerado um passo importante para a análise de expressão diferencial (HAAS et al., 2013). O Trinity foi executado usando as configurações padrões para montagem final, seguido de análise estatística (N_{50} , L_{50} , CG%) calculada pelo *script* acessório “*TrinityStats.pl*”. Adicionalmente, a análise da montagem foi realizada usando o pacote BioPython (COCK et al., 2009) usando os scripts internos do pacote Python. Os transcritos montados e gerados pelo Trinity foram alinhados ao banco de dados UniProt-trEMBL (APWEILER et al., 2004) pelo programa Diamond (BUCHFINK; XIE; HUSON, 2015).

A anotação funcional de cada transcrito foi realizada usando o pipeline Trinotate que inclui a identificação das famílias de proteínas do banco de dados do Pfam e UniProt-SwissProt (CONESA et al., 2016), identificação de peptídeos sinal com o software SignalP (PETERSEN et al., 2011), e as proteínas transmembranas com o programa TMHMM (BUSHNELL, 2018) e, a predição dos transcritos de rRNA foi avaliado pelo RNAmmer (LOVE et al., 2014). Para avaliar a similaridade, todos os transcritos montados foram comparados com as proteínas não redundantes disponíveis no banco de dados do Swiss-Prot, TrEMBL, CDD, Pfam e KOG usando a ferramenta BLAST com valor de significância $E\text{-value} < 10^{-5}$.

As categorias funcionais foram avaliadas por termos *gene ontology* (GO) utilizando o melhor BLASTX hit obtido do banco de dados das proteínas redundantes com o software BLAST₂GO, usando valor de significância $E\text{-value} < 10^{-5}$ e agrupados quanto a função biológica, molecular e quanto ao componente celular. Para melhorar a avaliação quanto a integridade da biblioteca dos transcriptomas e a eficácia do processo de anotação, os transcritos foram submetidos a análise de *Cluster* dos grupos ortólogos para classificação de genomas completos de eucariotos (KOG classification). As atribuições de rota foram realizadas por pesquisas da sequência contrastada com o banco de dados da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG), seguido de BLASTX ($E\text{-value} < 10^{-5}$).

2.2.2.4 Expressão gênica diferencial (DEGs) e genes candidatos em resposta ao glifosato.

As leituras com qualidade desejada foram mapeadas contra o transcriptoma de referência usando o pacote de bioinformática BBmap (BUSHNELL, 2018),

incluindo configurações específicas do transcriptoma. As contagens da leitura foram extraídas a nível gênico das transcrições (em vez de nível de isoforma) usando um *script* personalizado perl. Para cada repetição, a expressão em nível gênico foi estimada pelo método Kallisto (BRAY et al., 2016) implementado no *script* acessório do programa Trinity “*align_and_estimate_abundance.pl*” usado para gerar uma matriz de expressão usando outro *script* “*abundance_estimates_to_matrix.pl*”. A matriz foi processada usando o *script* “*run_DE_analysis.pl*” no modo edgeR (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010) para avaliar a expressão gênica diferencial. Finalmente, estes resultados foram submetidos a análise com o *script* “*analyze_diff_expr.pl*” (DEGs), que recebeu a anotação pelo GO gerados no pipeline Trinotate.

As DEGs foram avaliadas dentro de cada linha dos biótipos (suscetível e resistente) submetidos ou não ao glifosato, usando como referência o valor da taxa de descoberta falsa inferior a 5% (FDR<0,05). A listagem com todas as DEGs que apresentaram valor *p-value* menor que 0,05 foram exportadas para comparação. Os gráficos MA e Volcano foram produzidos dentro do DESeq2 e, as listas das DEGs, foram filtradas para remover genes com valor log de alteração (Log FC ≤ 2 e ≥ -2). Os genes não redundantes de todas as DEGs encontradas no biótipo suscetível e resistente com e sem glifosato presentes na listagem comum foram excluídos para descobrir os DEGs específicos em resposta ao herbicida glifosato (Figura 1). As funções dessas sequências foram pesquisadas na Ferramenta Básica de Pesquisa para Alinhamento Local usando o software Blastx.

A análise de componentes principais (PCA) foi avaliada a partir dos dados de contagem que apresentaram diferenças significativas entre os biótipos suscetível e resistente sem tratamento com glifosato. A expressão diferencial foi comparada entre biótipos suscetível e resistente para avaliar genes constitutivos diferencialmente expressos.

A abundância da expressão de cada transcrição montado foi mensurada através dos valores de leituras pareadas por kilobase por milhão (RPKM). Todas as leituras foram mapeadas para um conjunto de transcritos não redundantes para quantificar a abundância dos transcritos montadas.

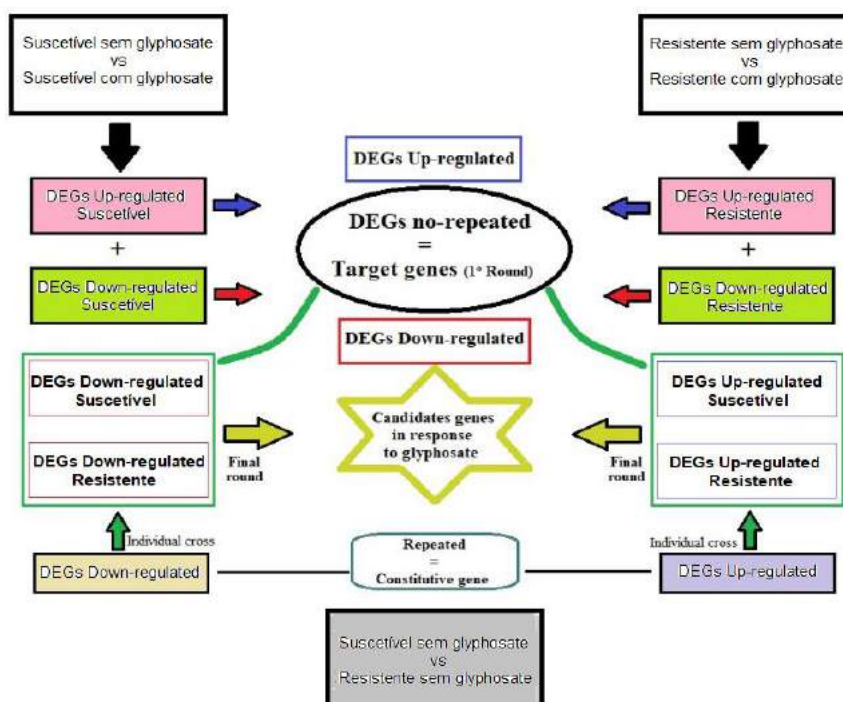


Figura 1- Esquema simplificado que foi desenvolvido para avaliação dos genes candidatos em resposta ao herbicida glifosato nos biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) para avaliar o mecanismo de resistência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019. A análise estatística foi baseada nos valores de Log Fold Change (Log FC \geq 2), P value e FDR value (<0,05).

O diagrama de Veen foi montado usando o software Draw Veen Diagram com leituras de mapeamento aplicadas para medição da expressão, usando valores de RPKM (RPKM>10) para cada leitura entre pares de amostras. Os conjuntos avaliados foram: biótipo suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) sem versus com herbicida; biótipo SVA02 versus SVA04 sem herbicida e, SVA04 versus SVA02 com glifosato onde foi usado como parâmetros os valores mínimos de expressão de Log FC \geq \pm 2 entre o biótipo de azevém suscetível e resistente com e sem o herbicida glifosato.

2.2.2.5 Acesso aos dados do RNA-Seq dos biótipos de azevém.

Os dados de RNA-seq gerados neste estudo podem ser baixados no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI-SRA), registrado com número de acesso (em processo de depósito).

2.2.3 RT-qPCR dos genes candidatos em resposta ao glifosato.

A metodologia para análise em RT-qPCR está descrita na sequência para melhor entendimento.

2.2.3.1 Síntese do cDNA dos biótipos de azevém.

A síntese do cDNA foi realizada a partir das amostras do RNA total remanescentes de cada tratamento avaliado em análise de transcriptoma, mantidas em ultrafreezer após extração. As reações para o cDNA foi obtido através do kit SuperScript™ First-Strand System for RT-PCR (Invitrogen™), seguindo as recomendações do fabricante. A diluição do RNA ($\pm 0,2\mu\text{g}$) foi realizado em 10 μL do mix composto por com 1 μL de dNTPs, 1 μL de Oligo DT e 8 μL de água. As amostras foram incubadas em termociclador por 5min a 65°C seguido de resfriamento em gelo por 1min. Posteriormente, em cada tubo foram adicionados 2 μL do tampão 10x RT, 4 μL de MgCl₂, 2 μL de DTT e 1 μL de RNase Out que foram incubados a 42°C por 2min, seguido da adição de 1 μL do SuperScript™ First-Strand System for RT-PCR. A reação foi submetida a termociclador por 50min à temperatura de 42°C para anelamento, seguido de aquecimento a 70°C por 15min para extensão da fita e resfriamento a 4°C para que ocorresse a síntese do cDNA.

2.2.3.2 Genes candidatos a referência e condições para RT-qPCR.

Para normalização da RT-qPCR foram considerados quatro genes candidatos de referência, usados como controle interno para análise de RT-qPCR (Tabela 2).

Tabela 2- Genes candidatos a referência para normalização da RT-qPCR em azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) ao herbicida glifosato. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019.

Gene	Sequência primer (5'→3') ¹	Referência
<i>GAPDH</i>	F- AACTGTTTCATGCCATCACTGCCAC R- AGGACATACCAGTGAGCTTGCCAT	Wan et al., (2010)
<i>18s</i>	F- AACACTTCACCGGACCATTCA R- CGTCCCTGCCCTTTGTACAC	Zhang; Hu, (2009)
<i>TUA5</i>	F- GGCTTGTGTCTCAGGTTATCTCATC R- CATGGAGGATGGCTCGAAGG	Clarke; Rahman, (2005)
<i>eEF1As</i>	F- CCGTTTTGTCGAGTTTGGT R- AGCAACTGTAACCGAACATAGC	Lee et al., (2010)

¹Forward (F) e reverse (R) primers.

Os genes de referência testados nos biótipos de azevém para avaliar o estresse herbicida causado pelo glifosato foram gliceral-dehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), 18S ribossomal RNA (*18s*), elongation factor 1-A (e*EF1As*) e tubulin (*TUA5*). A RT-qPCR dos genes alvos dos biótipos de azevém foi avaliada a partir da análise de transcriptoma (local alvo e não local alvo de ação) onde foram selecionados possíveis genes candidatos envolvidos na resistência do azevém ao glifosato (Tabela 3). Os *primers* foram desenhados com o software Primer 3 (UNTERGASSER et al., 2012) obtidos das sequências encontradas do transcriptoma.

Tabela 3- Genes alvos para RT-qPCR em azevém suscetível e resistente ao glifosato. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.

Código (Trinity)	Genes alvo	Sequência <i>primer</i> (5'→3')¹	Eficiência
Trinity_DN 125339_c4_g2	Peroxidase 1	F- GACACCGATGTTTCATGTGC R- GTGCGATTCAGGATTTTGGT	2,44
Trinity_DN 129234_c0_g4	Inositol Kinase	F- GCATCAACGTTAGGCAGTGA R- CCAAAGTTCCTTGACGAAGC	2,10
Trinity_DN 141928_c1_g1	ABC transporter 2	F- GGGAAAGCACAACACTGAAATC R- CAGGTTGTCTTAGACGGTTGC	2,14
Trinity_DN 133778_c0_g1	CYT P450 71A1	F- CGAACATGTCCAGGATTATAG R- CTCGAGAAGGTGATAGACGAC	2,06
Trinity_DN 139722_c2_g6	EPSPs	F- GCCGAGGAAACAATCAACAT R- GCAGGTTTCCGATTGAGAAG	2,46
Trinity_DN 135064_c0_g4	CYT P450 78A3	F- TGCATGAGTTCGAGTGGATG R- CCAAACGGGACACTACACA	2,11
Trinity_DN 117070_c0_g1	Glycosyltransferase	F- CGTAGTCGCGTACACACATA R- GGTCATCGAGGAGGCTATGG	2,21
Trinity_DN 125475_c1_g1	Gluthationa	F- GGAGGACTCACAAACAGGCT R- GGAGGAGACGATGTGAAGCT	1,8
Trinity_DN 127555_c0_g1	Peroxidase 2	F- GCTCCGATTGCTGAACATGG R- GCCCTTTCTTGATCGCAAT	2,12
Trinity_DN 135712_c0_g4	CYT P450	F- GTTTCTCGACATGGAACGCA R- TTGTCAGGGAGGTGATGTCC	2,15
Trinity_DN 140736_c3_g2	ABC transporter 4	F- GCTTGTTCCGGCGCTTGTC R- CGGCTATCTTCACCTCTTGC	2,02
Trinity_DN 116297_c0_g3	Protein detox	F- CGTTCTACTTGGCAGGCATC R- GGCTACCACAAACTATGCCG	1,93

¹Forward (F) e reverse (R) primers. Valores entre 1,8 a 2,2 indicam eficiência dos alvos ótima para RT-qPCR.

Para a reação de amplificação foram usados 6,25µL do reagente LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Applied Science), 0,5µL dos primers forward e

reverse (10mM), 1µL cDNA (0,2µg) e 4,25µL de água DEPC, totalizando 12,5µL da reação. A amplificação foi realizada em LightCycler 480 System nas seguintes condições: um ciclo a 95°C por 5min, 45 ciclos para desnaturação a 95°C por 20s, 60°C por 15s e 72°C por 20s. O processo foi interrompido pela curva de dissociação a 95°C por 5s com incubação a 70°C por 1min e aquecimento gradual a 0,11°C até 95°C. O produto foi incubado a temperatura de 40°C por 30s usando triplicatas do cDNA e a especificidade confirmada pela curva de melting.

2.2.3.3 Eficiência e análise da estabilidade dos genes candidatos a referência

A eficiência da PCR foi mensurada usando quatro diluições do cDNA (1:1, 1:5, 1:25 e 1:125) para gerar a curva padrão de cada par de primer testado. O valor E foi estimado pela equação $E=10^{(-1/\text{slope})}$ (RASMUSSEN, 2001), com valores considerados aceitáveis para os genes de referência variando entre 1,8 a 2,2. O ranking e a performance dos genes de referência foram avaliados pelos valores médios de Ct de cada amostra do ciclo de RT-qPCR. A expressão gênica foi avaliada com o auxílio da ferramenta da web RefFinder (<http://leonxie.esy.es/RefFinder/>) onde são integrados os algoritmos dos programas GeNorm (VANDESOMPELE et al., 2002), NormFinder (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004) e BestKeeper (PFAFFL et al., 2004) além do método comparativo ΔCt (SILVER et al., 2006), amplamente utilizados para estimar a estabilidade da expressão e para selecionar os genes alvo candidatos apropriados (CHEN et al., 2011). Os valores médios de Ct para cada amostra foram usados como dados de entrada no site.

Os resultados dos genes alvo dos biótipos de azevém foram comparados quanto as mudanças na expressão gênica, considerando a aplicação ou não do herbicida glifosato na dose de 2160 g e.a. ha⁻¹. O nível de expressão relativa (RE) para um determinado gene foi calculado pela formula $RE=2^{-(\Delta\Delta\text{CT})}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) onde ΔCt refere-se a diferença entre $\text{Ct}_{\text{sample}}$ da amostra e o menor valor Ct_{min} em todas as amostras. Os resultados foram submetidos a análise de variância ($p\leq 0,05$) e, as médias foram comparadas pelo teste Duncan ($p\leq 0,05$) e o efeito do herbicida comparado pelo teste t ($p\leq 0,05$).

2.3 Resultados e discussão

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

2.3.1 *Screening* e curva dose-resposta dos biótipos de azevém ao glifosato.

Os resultados do *screening* inicial para mapeamento e seleção dos biótipos de azevém evidenciou que 56 e 44% foram suscetíveis e resistentes ao glifosato na dose de 2160 g e.a. de glifosato ha⁻¹, respectivamente (Figura 2A e 2C).

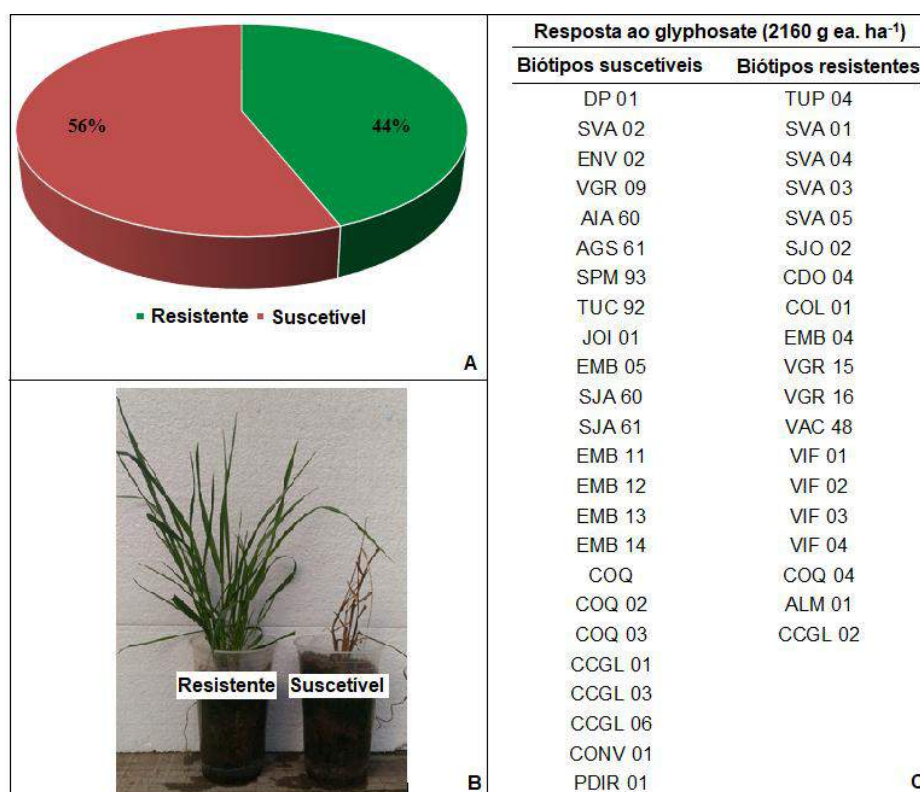


Figura 2- Resposta percentual dos biótipos resistentes e suscetíveis (A), controle visual (B) e lista dos biótipos suscetíveis e resistentes ao glifosato (C) submetidos a dose de 2160 g ea. ha⁻¹ avaliados 28 dias após a aplicação. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019.

Resultados obtidos em diversos levantamentos de campo demonstraram que o azevém resistente ao glifosato está presente em mais de quatro milhões de hectares na região Sul do Brasil onde tem ocorrido aumento dos casos de resistência e em área infestada, evidenciando a necessidade de adoção de medidas proativas para evitar a evolução da resistência (VARGAS et al., 2016). Após o *screening*, os biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) ao

glifosato foram selecionados, considerando a mesma região edafoclimáticas, para os estudos de curva dose resposta, análise de transcriptoma e expressão gênica e demais estudos desenvolvidos para confirmação dos mecanismos de resistência (Figura 2B).

A análise de variância para a curva dose resposta indicou interação entre os biótipos e doses do herbicida glifosato, com ajuste satisfatório ao modelo sigmoidal do tipo logístico obtendo-se valores do coeficiente de determinação (R^2) que variaram de 0,85 a 0,99 (Figura 3A e 3B).

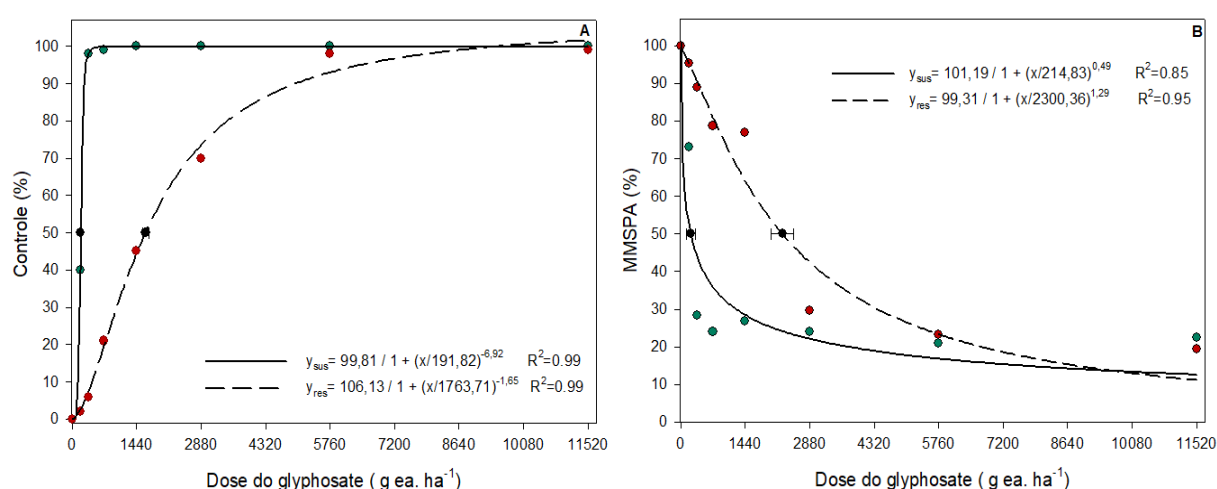


Figura 3- Curva dose-resposta para controle visual (A) e massa seca da parte aérea (B) dos biótipos de azevém submetidos a diferentes doses do herbicida glifosato. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019. Os pontos representam os valores médios de cada biótipo.

Tabela 4- Valores de C_{50} e GR_{50} com o intervalo de confiança (IC 95%) e fator de resistência (RF) de biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) submetidos a diferentes doses do herbicida glifosato, aos 28 dias após a aplicação (DAA). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.

Biótipo	C_{50} ¹		Fator de resistência ² (RF)
	g e.a. ha ⁻¹	95 IC	
Suscetível (SVA02)	192	191,6 - 192,4	-
Resistente (SVA04)	1645	1573,6 - 1716,4	8,6
Biótipo	GR_{50} ¹		Fator de resistência ² (RF)
	g e.a. ha ⁻¹	95 IC	
Suscetível (SVA02)	225	127,4 - 322,6	-
Resistente (SVA04)	2275	2021,9 - 2528,1	10,1

¹ C_{50} e/ou GR_{50} = dose necessária para controle ou reduzir a massa seca em 50%.

²FR obtido pela divisão da C_{50} e/ou GR_{50} do biótipo resistente pelo suscetível.

Os resultados de controle aos 28 DAA evidenciaram que o C_{50} do biótipo suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) foi de 192 e 1645 g e.a. ha⁻¹ do herbicida

glifosato (Figura 3A, Tabela 4). Ao avaliar a GR₅₀, os valores obtidos para o biótipo SVA02 e SVA04 foram de 225 e 2275 g e.a. de glifosato ha⁻¹, respectivamente (Figura 3B, Tabela 4). Após constatada a resistência para o biótipo SVA04, foi calculado o fator de resistência (FR) que foi de 8,6 e 10,1 com base nos valores de C₅₀ e GR₅₀, respectivamente (Tabela 4). Resultados semelhantes foram observados em diferentes biótipos de *L. multiflorum* Lam. resistentes ao glifosato coletados em campos do Arkansas-EUA onde os valores de GR₅₀ variaram de 945 a 1596 g e.a. ha⁻¹, evidenciando nível intermediário de resistência (SALAS et al., 2012). Todavia, alterações quanto ao nível de resistência dos biótipos de azevém podem ocorrer em função das práticas de manejo adotadas pelo produtor. Em todos os casos, a sobrevivência de biótipos a herbicidas é indesejável devido os efeitos negativos da interferência e alteração quanto a medidas de manejo com aumento de custos para controle. Dessa forma, compreender os mecanismos de resistência envolvidos em biótipos de azevém através da avaliação do transcriptoma é de suma importância para propor medidas de manejo eficientes e auxiliar na redução da resistência.

2.3.2 Sequenciamento do transcriptoma e montagem *de novo*.

Ao todo foram sequenciadas doze bibliotecas do transcriptoma em plataforma Illumina HiSeq₂₅₀₀ oriundos dos biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) submetidos ou não ao herbicida glifosato (2160 g e.a. ha⁻¹). Após análise em bioinformática, os resultados do transcriptoma e montagem das sequências evidenciaram um total de 26368711951 pares de bases sequenciadas, produzindo 155613732 leituras com comprimento médio de 311pb (Tabela 5).

Tabela 5- Resultados da montagem *de novo* transcriptoma dos biótipos de azevém resistente e suscetível ao glifosato. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019.

Descrição	Estatísticas da montagem*
Total de leituras montadas	155613732
Comprimento médio das leituras	311
Total de pares de bases sequenciadas	26368711951
Total de transcritos	232748
Tamanho médio das contigs	575,24
Tamanho de contigs N50	740
Relação GC (%)	50,47

*Os dados completos do transcriptoma estão disponíveis no material suplementar.

Para as leituras brutas usadas na montagem do *de novo* transcriptoma, os resultados estatísticos demonstraram que mais de 99,9% das sequências apresentaram valor Phred \geq Q30 ao nível de probabilidade de erro a 0,01%. Além disso, o transcriptoma foi construído a partir de 157784873pb, gerando 232748 transcritos com comprimento inferior a 500 bp, os quais foram utilizados para a montagem de 87433 contigs com N50 igual a 740bp (Tabela 5). Os resultados estatísticos quanto a distribuição das contigs em relação ao comprimento demonstraram redução no número total das contigs, usando como limite sequências de transcritos com comprimento variando de 0 a 2500pb (Figura 4). Contigs com comprimento menor que 500pb foi evidenciado em 146263 contigs, representando mais de 68% do transcriptoma total (Figura 4).

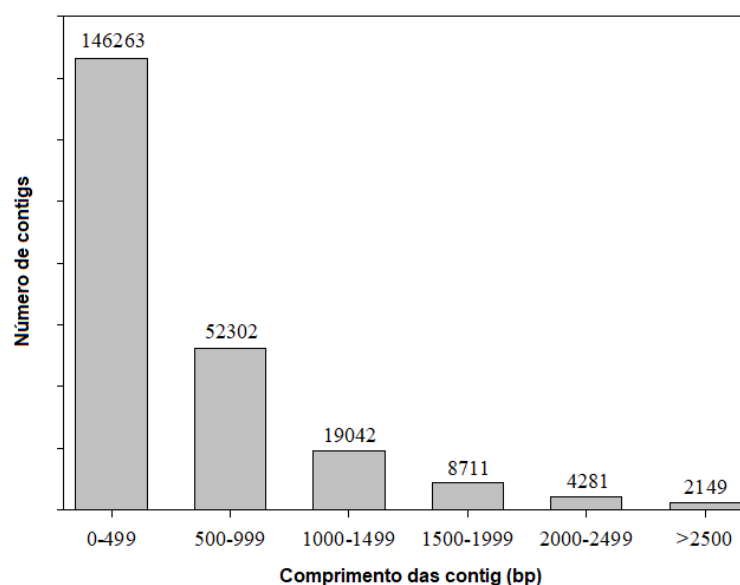


Figura 4- Distribuição das contigs quanto ao comprimento dos transcritos montados das bibliotecas do transcriptoma sequenciadas em biótipos de azevém suscetível e resistente. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.

2.3.3 Anotação funcional das montagens pelo gene ontology e KEGG.

As contigs foram anotadas através da análise conjunta usando o banco de dados do UniProtKB (Uniprot Consortium, 2012) e PFam (PUNTA et al., 2012) tendo como ponto de corte valor $E \leq 1 \times 10^{-5}$. A relação dos transcritos (top 10 BLAST Hits) com maior similaridade aos biótipos de *L. multiflorum* Lam. foram identificadas pela anotação funcional (Figura 5). Os resultados do transcriptoma quanto ao top 10 BLAST Hits evidenciaram maior similaridade dos transcritos com *Triticum aestivum* L. (32,68%) seguido de *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. com 15,86% e

Hordeum vulgare L. com 15,77%, representando mais de 64% do total das contigs e que apresentaram maior probabilidade após o BLAST no transcriptoma de referência (Figura 5). Resultados similares da anotação funcional foram reportados em *L. rigidum* Gaudin. apresentando maior similaridade com *B. distachyon* (L.) P. Beauv. e *H. vulgare* L. totalizando mais de 60% das contigs totais (GAINES et al., 2014).

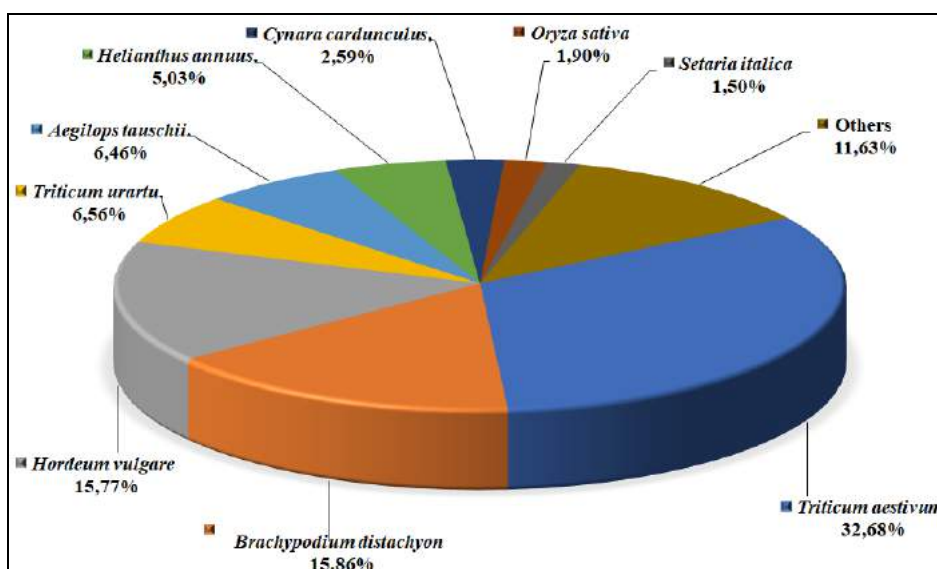


Figura 5- Transcritos conservados (%) dos biótipos de azevém suscetível e resistente ao glifosato em diferentes espécies. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019. Top 10 BLAST hits.

A classificação geral das DEGs (Top 12 terms) dos biótipos de azevém suscetível e resistente ao glifosato pelo *gene ontology* (GO) evidenciou que mais de 87% das DEGs envolvem processos biológicos, 74% para funções moleculares e 96% para os componentes celulares foram representados pelo Top 12 terms. Em biótipos de azevém, o glifosato alterou processos metabólicos ($\pm 10\%$), a fosforilação de proteínas ($\pm 9\%$), processos redox ($\pm 6\%$), transporte transmembrana ($\pm 5\%$) além desencadear mudanças expressivas para DEGs mapeadas sem processo biológico ou função molecular conhecida (dados não apresentados). A classificação individual das DEGs dos biótipos suscetível e resistente evidenciaram que a maioria dos processos biológicos e moleculares ainda não são conhecidos em resposta ao herbicida (Figura 6). Ao avaliar as principais DEGs up-regulated no biótipo resistente, os resultados demonstraram que ocorre alterações em processos metabólicos, transporte transmembranas e atividade redox (Figura 6A e 6B). Para o biótipo suscetível, processos de ligação do DNA, RNA e proteínas, atividade de transferases e outros processos do metabolismo foram afetados (Figura 6E e 6F).

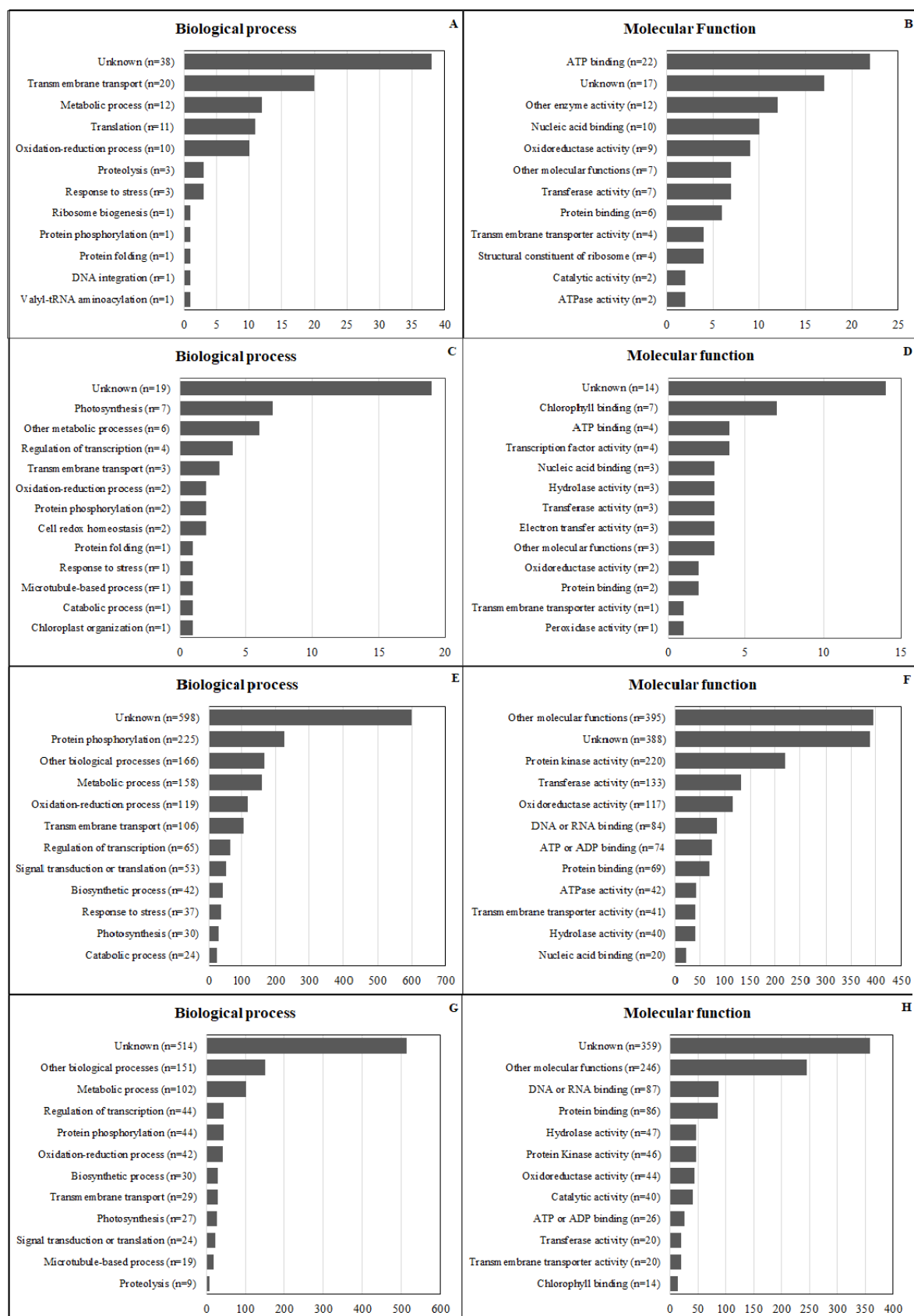


Figura 6- Classificação individual das DEGs quanto ao processo biológico e função molecular em biótipos de azevém suscetível e resistente ao glifosato. FAEM/UFPEI, Capão do Leão/RS, 2019. DEGs up-regulated (A e B) e down-regulated (C e D) em biótipo resistente, DEGs up-regulated (E e F) e down-regulated (G e H) em biótipo suscetível.

De maneira similar, alterações em processos metabólicos e atividade catalítica foram reportados em *E. indica* em resposta ao glifosato (CHEN et al., 2017). Os resultados de GO nos biótipos suscetível e resistente evidenciaram que para os DEGs down-regulated em resposta ao herbicida ocorrem alterações em processos biológicos e moleculares envolvidos na ligação de ATP e ácido nucléico, fosforilação de proteínas, atividade enzimática diferencial, processos redox, transporte transmembranas e outras modificações em processos metabólicos (Figura 6C, 6D, 6G e 6H). As respostas do glifosato em plantas suscetíveis devido a inibição competitiva da enzima EPSPs com a PEP na rota do chiquimato envolvem o aumento da atividade da enzima 3-deoxy-D-arbinoheptulose-7-phosphate (DAHP) sintase que acarreta em desbalanço no fluxo de carbono (ZABALZA et al., 2017), afetando a síntese de carboidratos, aminoácidos e outros compostos do metabolismo secundário (MAROLI et al., 2018b).

Em plantas resistentes, a maioria dos relatos envolvendo a ausência de efeitos do herbicida devem-se a ocorrência de mutações e/ou superexpressão do gene EPSPs que afetam a afinidade com o substrato, ou ainda, pela redução da absorção e translocação, aumento do metabolismo, sequestro vacuolar e rápida necrose (SALAS et al., 2012; SAMMONS; GAINES, 2014; MORETTI et al., 2016). Dessa forma, as informações envolvendo o sequenciamento do transcriptoma são importantes na investigação dos mecanismos de regulação fisiológicas e do metabolismo que podem proporcionar aumento de tolerância ao herbicida após sua exposição. Recentemente, estudos avaliando o mecanismo de resistência através da análise de transcriptoma em biótipos de *Amaranthus palmeri* S. Watson ao herbicida glufosinato de amônia reportaram a regulação gênica diferencial em rotas de biossíntese, processo metabólico de pequenas moléculas e atividade oxido-redutases como as principais envolvidas (SALAS-PEREZ et al., 2018). A análise de transcriptoma dos biótipos de azevém comparando a resposta ao glifosato demonstrou que processos moleculares, bioquímicos e fisiológicos estão envolvidos e podem auxiliar no entendimento do mecanismo de resistência.

2.3.4 Identificação e anotação das DEGs.

Os níveis de expressão dos transcritos foram calculados em função dos valores de *Fragments per thousand bases per million read* (FPKM), tendo como

referência estatística os valores de $\text{Log FC} \geq 2$, P value e *false discovery rate* (FDR) ≤ 0.05 (Figura 7).

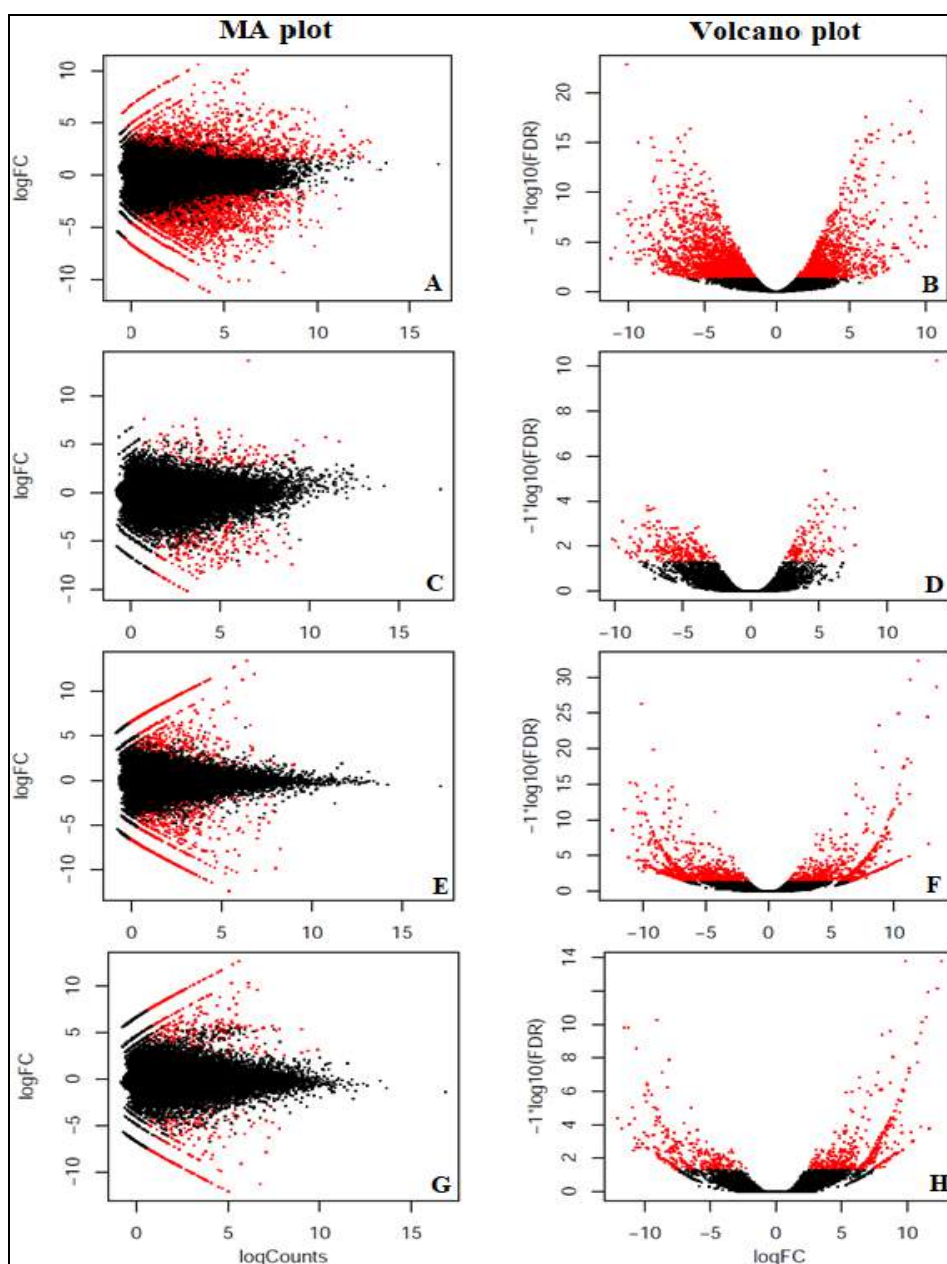


Figura 7- Ma plot das DEGs geradas pelo EdgeR após filtragem com um valor mínimo de cobertura e Volcano plot comparando o false discovery rate entre os tratamentos. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2019. A comparação entre biótipo suscetível sem e com glifosato (A e B), biótipo resistente sem e com glifosato (C e D), biótipo suscetível e resistente sem glifosato (E e F) e, biótipo suscetível e resistente com glifosato (G e H).

Os DEGs para o biótipo suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) submetidos ou não ao glifosato na dose de 2160 g e.a. ha⁻¹ foram sumarizados no diagrama de Venn, demonstrando a resposta individual e as relações de sobreposição (Figura 8). Entre todos os transcritos com valor RPKM > 10, 39854 transcritos foram expressos

em todos os tratamentos (biótipos e herbicida), 3149 e 3151 transcritos foram co-expressos no biótipo suscetível e resistente com e sem herbicida, respectivamente. Por outro lado, 2691 e 1043 foram os transcritos que apresentaram co-expressão entre os biótipos suscetível e resistente sem herbicida e entre os biótipos expostos ao glifosato, respectivamente (Figura 8).

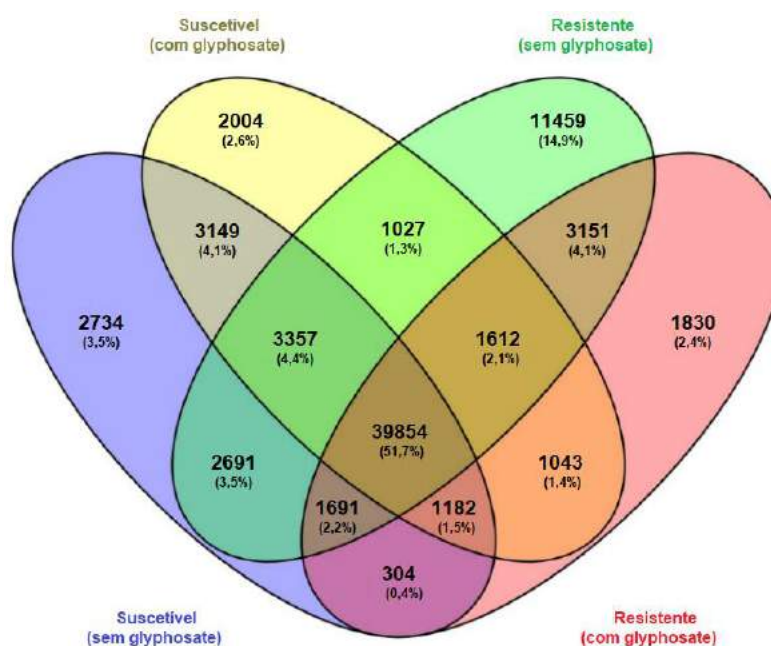


Figura 8- Diagrama de Venn representando o número de transcritos expressos (RPKM>10) em biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) ao glifosato submetidos ou não ao herbicida na dose de 2160 g e.a. ha⁻¹. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019. Cada círculo representa o conjunto específico de transcritos.

Ao avaliar individualmente cada tratamento, foram encontrados 2734 transcritos expressos especificamente no biótipo suscetível sem herbicida e 2004 transcritos para o biótipo SVA02 exposto ao glifosato. Para SVA04 foram 11459 e 1830 transcritos foram expressos de forma específica no biótipo resistente sem e com herbicida glifosato, respectivamente (Figura 8). A maioria dos resultados envolvendo estudos de transcriptoma para avaliar a resposta de plantas daninhas a herbicidas reportam que poucos genes podem desempenhar um papel chave na resistência, afetando processos do metabolismo e impedindo a correta ligação do herbicida no alvo de ação (GAINES et al., 2014; CHEN et al., 2017).

A magnitude das alterações provocadas nos biótipos de azevém expostos ou não ao glifosato foram agrupados pelo Heat-map (Figura 9A) e hierarchical clustering

(Figura 9B), permitindo uma abordagem visual da análise da expressão diferencial para o conjunto de dados explorados na análise de transcriptoma.

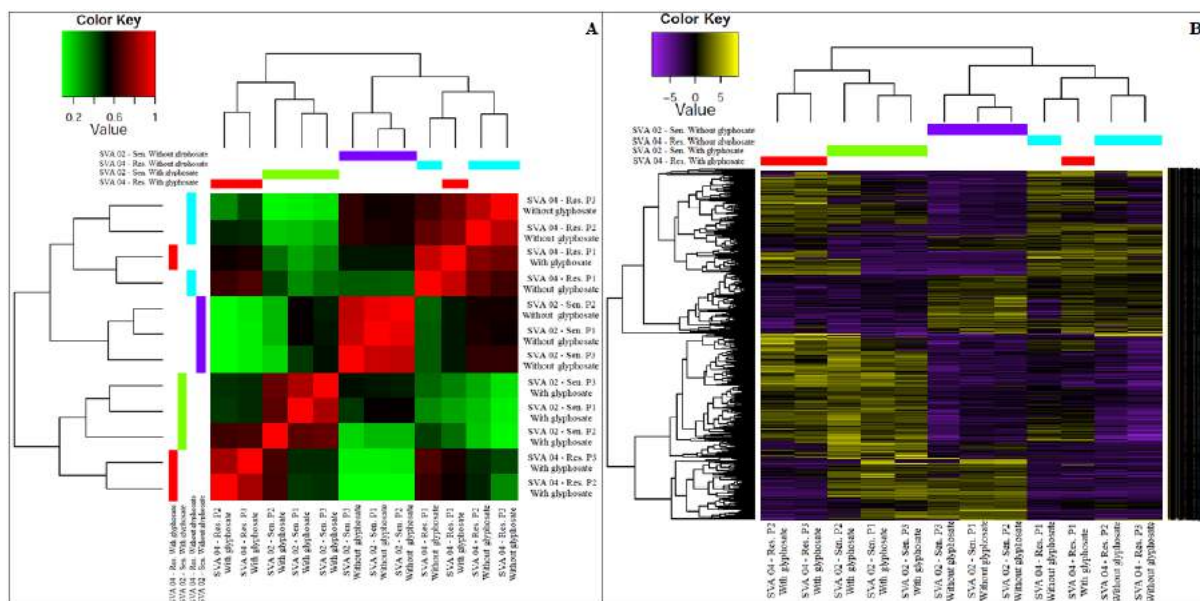


Figura 9- Heat-map da correlação de Spearman's (A) e hierarchal clustering (B) dos níveis de expressão dos transcritos oriundos de todos os tratamentos (coluna) comparado contra cada par da amostra (linha). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.P₁, P₂ e P₃ são as repetições biológicas. Cor verde e violeta representa DEGs down-regulated enquanto vermelho e amarelo são DEGs up-regulated em função do valor FPKM.

O agrupamento dos dados de transcriptoma na forma de matriz permite analisar através da correlação uma amostra ou tratamento a outro, permitindo examinar de forma instantânea o perfil molecular e o nível de atividade genômica. O conjunto de entrada dos dados para avaliação do agrupamento hierárquico nas análises de transcriptoma é realizado com base nos cálculos de algoritmos dos clusters, sendo considerada uma ferramenta importante para medir a similaridade ou dissimilaridade entre cada par de tratamento e, permite separar grupos homogêneos de heterogêneos quanto ao nível de expressão gênica (BROOM et al., 2017).

Ao avaliar os transcritos específicos para cada tratamento, os resultados evidenciaram que 1671 e 1071 DEGs foram up- e down-regulated na comparação com o biótipo suscetível sem e com glifosato; 124 DEGs foram up-regulated e 60 down-regulated ao avaliar o biótipo resistente com e sem herbicida, enquanto que para a comparação entre o biótipo suscetível e resistente, 315 e 427 DEGs foram up- e down-regulated na ausência do herbicida glifosato, respectivamente (Figura 10A). Após avaliação e filtragem dos transcritos específicos dos biótipos de azevém

em resposta ao glifosato, foram identificados 102 e 50 DEGs up- e down-regulated para o biótipo resistente enquanto que para o biótipo suscetível foram reportados 1623 e 1035 up- and down-regulated, respectivamente (Figura 10B).

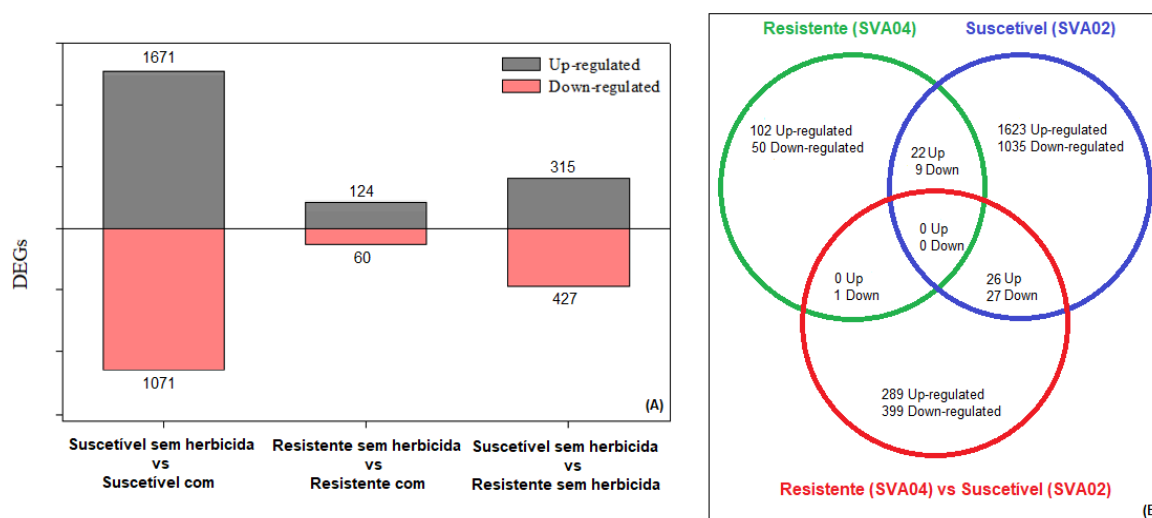


Figura 10- DEGs up- e down-regulated na comparação entre os grupos (A) e transcritos específicos (B) em biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) ao glifosato expressos 24 HAT. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2019.

A anotação das DEGs específicas dos biótipos em resposta ao glifosato evidenciou que a maioria dos genes candidatos não foram caracterizados quanto a função biológica e molecular. Em plantas suscetíveis, a enzima EPSPs é inibida pelo glifosato afetando a biossíntese de aminoácidos aromáticos e diferentes processos fisiológicos, como a fotossíntese e o metabolismo do carbono, levando à morte das plantas (GOMES et al., 2014). A sobrevivência de populações de plantas daninhas resistentes após a exposição ao herbicida glifosato pode ocorrer devido ao local alvo ou não-alvo, incluindo os mais comuns, como a redução do transporte celular e a enzima EPSPs insensível (POWLES; PRESTON, 2006). Entretanto, os resultados não demonstraram nenhum dos DEG up-regulated envolvendo o local alvo de ação como provável mecanismo de resistência no biótipo resistente (Tabela 6). Para o glifosato, o aumento na expressão de cópias da EPSPs como o mecanismo de resistência foi evidenciado em diversas plantas daninhas como *Kochia scoparia* L. (WIERSMA et al., 2015), *L. multiflorum* Lam. (SALAS et al., 2015) e *A. palmeri* S. Watson (GAINES et al., 2010). Outros estudos demonstraram ainda que mutações do gene EPSPs, especialmente na Ala₁₀₂ e Pro₁₀₆, também podem conferir

resistência ao herbicida devido a mudanças na afinidade com o substrato, impedindo a inibição da enzima (YU et al., 2015).

Para os DEGs up-regulated no biótipo SVA04 foram identificados um ABC transportador família 4, três citocromos P₄₅₀ monooxigenases, seis glicosiltransferases, uma peroxidase e duas proteínas de detoxificação envolvidas possivelmente no mecanismo de resistência para o não local alvo de ação (Tabela 6). Os resultados demonstraram que pode haver mais de um mecanismo de resistência ao herbicida glifosato para o biótipo SVA04. A degradação do glifosato em compostos não e/ou menos tóxicos como AMPA, sarcosina e glioxilato tem sido pouco relatado para os casos de resistência envolvendo plantas daninhas e, sua contribuição na sobrevivência das plantas (SAMMONS; GAINES, 2014). Em recente estudo avaliando o mecanismo de resistência em biótipos de *E. colona* (L.) Link. resistentes ao glifosato foi evidenciado redução no acúmulo de chiquimato, ausência de metabolismo diferencial do herbicida e, aumento potencial na atividade de enzimas do sistema antioxidante que podem acarretar na sobrevivência das plantas (GOH et al., 2018). Todavia, resultados demonstram que a oxidação do glifosato à AMPA em plantas leguminosas pode contribuir na resistência ao herbicida (REDDY et al., 2008). Em plantas de soja e canola Roundup Ready[®], o aumento da atividade da enzima glifosato oxido-redutase (GOX) e modificações na N-acetiltransferase auxiliaram na metabolização do glifosato em AMPA e na sobrevivência das plantas após exposição ao glifosato (DUKE, 2011).

Estudos tem reportado o papel da citocromo P₄₅₀ sobre o mecanismo de resistência de plantas daninhas em resposta a herbicidas onde atuam em etapas da detoxificação através da clivagem de moléculas usando elétrons do NADPH (DÉYLE, 2013; GAINES et al., 2014; DUHOUX et al., 2015). As peroxidases, por sua vez, são uma grande família de enzimas que atuam em vários processos biológicos para decompor o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e proteger as células contra o dano oxidativo (MITTLER, 2017). Os genes candidatos com papéis conhecidos sobre os mecanismos de resistência a herbicidas como ABC transportadores, GSTs, glicosiltransferases, citocromos P₄₅₀ e enzimas do complexo antioxidante são a base da regulação de diversos processos do metabolismo e, tendem a apresentar níveis de expressão diferencial entre biótipos suscetíveis e resistentes a herbicidas (DÉYLE, 2013; SALAS-PEREZ al., 2018).

Tabela 6- DEGs relacionadas ao local alvo e não local alvo de ação após análise de transcriptoma em biótipos de azevém suscetível e resistente em resposta ao glifosato na dose de 2160 g e.a. ha⁻¹. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.

DEGs Up-regulated – Biótipo resistente (SVA04)					
Gene ID	Uniprot ID	Descrição	logFC	P Value	FDR
TRINITY_DN140736_c3_g2	A0A1D8MIX5	ABC transporter 4	27,964	0,0001	0,0202
TRINITY_DN136882_c0_g1	Q9AVM3	Cytochrome P450	53,000	0,0001	0,0219
TRINITY_DN135712_c1_g4	A0A1C9U428	Cytochrome P450	18,811	0,0005	0,0490
TRINITY_DN135712_c1_g5	A0A1C9U428	Cytochrome P450	17,752	0,0001	0,0181
TRINITY_DN125958_c0_g2*	A0A1D6CIL6	Glycosyltransferase	337,000	0,0004	0,0433
TRINITY_DN140278_c5_g4	A0A1D5TRN5	Glycosyltransferase	12,383	0,0002	0,0276
TRINITY_DN112899_c0_g3	A0A1D5UWD9	Glycosyltransferase	58,250	0,0004	0,0444
TRINITY_DN123097_c0_g1	A0A1D6AP30	Glycosyltransferase	26,917	0,0003	0,0306
TRINITY_DN125138_c7_g1	A0A1Q0XS76	Glycosyltransferase	12,804	0,0002	0,0269
TRINITY_DN125138_c7_g3	A0A1D5TMV0	Glycosyltransferase	13,880	0,0001	0,0182
TRINITY_DN127555_c0_g1*	F2D359	Peroxidase	32,222	0,0005	0,0449
TRINITY_DN137326_c2_g1	M8BEN7	Protein detoxification	61,000	0,0003	0,0350
TRINITY_DN116297_c0_g3*	A0A287E7I0	Protein detoxification	78,842	0,0001	0,0226
DEGs Down-regulated – Biótipo resistente (SVA04)					
TRINITY_DN135064_c0_g4*	M8BDG0	Cytochrome P450 78A3	-4,858	0,0001	0,0166
TRINITY_DN125339_c4_g2*	A0A096UN06	Peroxidase	-3,009	0,0005	0,0480
DEGs Up-regulated – Biótipo suscetível (SVA02)					
TRINITY_DN141928_c1_g1	R7W5T0	ABC transporter	3,534	0,0054	0,0440
TRINITY_DN99911_c0_g2	M7ZSS2	ABC transporter	19,571	0,0001	0,0030
TRINITY_DN142088_c17_g8	M8AS31	ABC transporter	10,666	0,0017	0,0191
TRINITY_DN85421_c0_g1	A0A1D8MIY6	ABC transporter	8,104	0,0003	0,0061
TRINITY_DN133778_c0_g1*	M8C4M2	Cytochrome P450 71A1	13,923	0,0001	0,0035
TRINITY_DN133778_c0_g3	M8C4M2	Cytochrome P450 71A1	15,500	0,0039	0,0349
TRINITY_DN123387_c0_g1	N1QZF8	Cytochrome P450 71D7	6,056	0,0049	0,0409
TRINITY_DN137998_c2_g1	N1QZF8	Cytochrome P450 71D7	27,228	0,0001	0,0025
TRINITY_DN139578_c1_g1	N1QY09	Cytochrome P450 81D1	11,235	0,0034	0,0317

Continuação...

Gene ID	Uniprot ID	Descrição	logFC	P Value	FDR
TRINITY_DN124861_c0_g3	R9WS10	Cytochrome P450	33,203	0,0012	0,0148
TRINITY_DN115219_c0_g1	C4RA43	Glutathione S-transferase	10,064	0,0036	0,0327
TRINITY_DN121292_c0_g1	Q9ZS17	Glutathione transferase	4,704	0,0036	0,0330
TRINITY_DN125531_c0_g1	Q9SB98	Glutathione transferase	10,593	0,0029	0,0283
TRINITY_DN125643_c1_g1	Q9SB98	Glutathione transferase	11,950	0,0054	0,0436
TRINITY_DN115561_c0_g1	I1IRW8	Glycosyltransferase	6,255	0,0003	0,0050
TRINITY_DN116240_c0_g1	F2DJP7	Glycosyltransferase	6,255	0,0005	0,0051
TRINITY_DN117070_c0_g1	F2DGL0	Glycosyltransferase	23,285	0,0003	0,0053
TRINITY_DN120042_c0_g1	A0A077RTX0	Glycosyltransferase	9,589	0,0018	0,0201
TRINITY_DN120479_c0_g1	F2D634	Glycosyltransferase	14,562	0,0002	0,0047
TRINITY_DN120614_c0_g2	I1GU56	Glycosyltransferase	6,158	0,0015	0,0173
TRINITY_DN121990_c0_g3	C4MF46	Glycosyltransferase	6,937	0,0005	0,0076
TRINITY_DN124988_c0_g3	B6TSL5	Glycosyltransferase	19,800	0,0001	0,0024
TRINITY_DN124988_c0_g7	A0A1D5UXW8	Glycosyltransferase	45,250	0,0038	0,0341
TRINITY_DN129577_c1_g4	A0A287HI50	Glycosyltransferase	25,555	0,0002	0,0040
TRINITY_DN130648_c1_g2	I1J0G6	Glycosyltransferase	16,400	0,0006	0,0087
TRINITY_DN130648_c1_g4	F2DGL0	Glycosyltransferase	16,000	0,0013	0,0155
TRINITY_DN138050_c1_g2	F2D634	Glycosyltransferase	9,125	0,0043	0,0375
TRINITY_DN138050_c1_g3	C4MF57	Glycosyltransferase	14,080	0,0001	0,0036
TRINITY_DN139774_c3_g3	W5BMP6	Glycosyltransferase	7,071	0,0059	0.04675
TRINITY_DN96730_c0_g2	A0A077RXS2	Glycosyltransferase	20,000	0,0004	0.0067
TRINITY_DN102163_c0_g1	A0A1D5Z6S3	Glycosyltransferase	12,750	0,0059	0.0470
TRINITY_DN109237_c0_g1	W5BMP6	Glycosyltransferase	41,500	0,0002	0.00430
TRINITY_DN118047_c1_g1	A0A1D6CFF0	Glycosyltransferase	7,569	0,0013	0.0159
TRINITY_DN118148_c0_g3	A0A1D6DEC7	Glycosyltransferase	6,063	0,0030	0.0288
TRINITY_DN122212_c0_g2	A0A1D5VBE5	Glycosyltransferase	5,607	0,0028	0.02753
TRINITY_DN122274_c1_g3	A0A1D6SFG9	Glycosyltransferase	8,333	0,0054	0.04400
TRINITY_DN122615_c0_g1	F2CPU0	Glycosyltransferase	6,152	0,0035	0.0321

Continuação...

Gene ID	Uniprot ID	Descrição	logFC	P Value	FDR
TRINITY_DN123537_c1_g2	A0A1D5WWX3	Glycosyltransferase	12,945	0,0007	0.0099
TRINITY_DN123688_c0_g2	W5C413	Glycosyltransferase	22,538	0,0004	0.0067
TRINITY_DN124487_c2_g1	A0A1D5SS60	Glycosyltransferase	6,342	0,0001	0.0027
TRINITY_DN124635_c0_g1	A0A1D5TSV0	Glycosyltransferase	7,000	0,0043	0.0372
TRINITY_DN124988_c0_g1	A0A1D5TMV0	Glycosyltransferase	65,000	0,0004	0.00727
TRINITY_DN124988_c0_g2	A0A1D5YPX1	Glycosyltransferase	14,875	0,0001	0.0035
TRINITY_DN125138_c7_g5	A0A1D5TMV0	Glycosyltransferase	11,636	0,0026	0.02583
TRINITY_DN125958_c0_g5	C4MF46	Glycosyltransferase	14,157	0,0008	0.0116
TRINITY_DN128036_c4_g1	A0A1D6DEC7	Glycosyltransferase	13,666	0,0023	0.0240
TRINITY_DN129577_c2_g3	A0A1D5TRD2	Glycosyltransferase	8,777	0,0020	0.02110
TRINITY_DN131125_c1_g2	C4MF46	Glycosyltransferase	12,642	0,0002	0.0044
TRINITY_DN132159_c1_g1	A0A077RHL6	Glycosyltransferase	37,000	0,0017	0.0191
TRINITY_DN132159_c1_g2	A0A1D6C373	Glycosyltransferase	8,744	0,0001	0.0024
TRINITY_DN134070_c0_g2	I1HHD0	Glycosyltransferase	5,205	0,0054	0.0440
TRINITY_DN135990_c1_g3	I1IAW3	Glycosyltransferase	121,000	0,0003	0.0051
TRINITY_DN135990_c1_g4	I1IAW3	Glycosyltransferase	33,750	0,0001	0.0024
TRINITY_DN136497_c1_g2	C4MF33	Glycosyltransferase	5,009	0,0007	0.0096
TRINITY_DN138276_c0_g3	W5EKM0	Glycosyltransferase	8,933	0,0001	0.0033
TRINITY_DN138892_c1_g2	I1HQP3	Glycosyltransferase	5,016	0,0052	0.0425
TRINITY_DN139466_c1_g5	M8B338	Glycosyltransferase	10,428	0,0034	0,0318
TRINITY_DN140278_c5_g3	A0A1D5UWD9	Glycosyltransferase	9,500	0,0021	0,0221
TRINITY_DN141174_c2_g3	C4MF57	Glycosyltransferase	10,741	0,0001	0,0022
TRINITY_DN141436_c7_g3	A0A077RXS2	Glycosyltransferase	177,000	0,0001	00023
TRINITY_DN19908_c0_g1	C4MF52	Glycosyltransferase	35,000	0,0046	0,0392
TRINITY_DN115610_c0_g3	F2CZF9	Glycosyltransferase	18,000	0,0019	0,0207
TRINITY_DN138417_c1_g2	D8L9S9	Glycosyltransferase	5,714	0,0030	0,0287
TRINITY_DN131428_c3_g1	A0A165FYU2	Glutathione S-transferases	3,905	0,0063	0,0488
TRINITY_DN131428_c3_g3	A0A165FYR3	Glutathione S-transferases	4,465	0,0030	0,0289

Continuação...

Gene ID	Uniprot ID	Descrição	logFC	P Value	FDR
TRINITY_DN130622_c0_g2	A0A1D6RT39	NADH-CYT b5 reductase	3,807	0,0033	0,0307
TRINITY_DN140198_c1_g1	A0A0Q3JBR5	NADPH-CYT P ₄₅₀ reductase	24,000	0,0009	0,0121
TRINITY_DN138714_c0_g1	A0A1D6C890	O-acyltransferase	5,860	0,0042	0,0371
TRINITY_DN112600_c1_g2	Q5U1I2	Peroxidase	7,787	0,0006	0,0093
TRINITY_DN139408_c4_g2	O81525	Peroxidase	11,144	0,0005	0,0084
TRINITY_DN139408_c4_g3	O81524	Peroxidase	9,315	0,0001	0,0029
TRINITY_DN101279_c1_g1	B4F6F0	Peroxidase	6,415	0,0031	0,0293
TRINITY_DN110339_c0_g1	C6ETA5	Peroxidase	7,939	0,0003	0,0054
TRINITY_DN120722_c0_g1	A0A251UL54	Peroxidase	28,212	0,0019	0,0207
TRINITY_DN129860_c3_g1	A0A1D6RK35	Peroxidase	11,515	0,0045	0,0384
TRINITY_DN85923_c0_g1	A0A1D6CL41	Peroxidase	56,000	0,0003	0,0052
TRINITY_DN115541_c0_g1	Q9ATU1	Cytochrome P450	31,062	0,0002	0,0039
TRINITY_DN135634_c3_g3	Q9ATU1	Cytochrome P450	5,014	0,0002	0,0040
TRINITY_DN135634_c3_g4	Q9ATU4	Cytochrome P450	5,333	0,0001	0,0030
TRINITY_DN140911_c2_g1	Q9ATU6	Cytochrome P450	5,876	0,0001	0,0031
TRINITY_DN120423_c0_g3	R7W8V3	Cytochrome P450 71D11	40,000	0,0003	0,0056
TRINITY_DN125475_c1_g1	M8A3A2	Glutathione S-transferase	17,448	0,0024	0,0241
TRINITY_DN132421_c0_g1	M8BYL5	Glycosyltransferase	7,309	0,0016	0,0179
TRINITY_DN125769_c0_g1	A0A251UMZ3	Heme peroxidase	38,800	0,0016	0,0185
TRINITY_DN138445_c0_g6	C8YTM5	N-methyltransferase	5,155	0,0003	0,0049
TRINITY_DN132159_c1_g3	A0A1E5UJA5	UDP-glycosyltransferase 87A2	6,540	0,0021	0,0222
DEGs Down-regulated – Biótipo suscetível (SVA02)					
TRINITY_DN128631_c0_g2	V5ZDY2	Cytochrome P450	-3,503	0,0021	0,0224
TRINITY_DN129556_c1_g2	A0A1D6CIU8	Glutathione peroxidase	-1,129	0,0030	0,0286
TRINITY_DN113092_c0_g2	F2CUZ3	Glycosyltransferase	-4,672	0,0021	0,0218
TRINITY_DN89430_c2_g1	A0A1D5SS62	Glycosyltransferase	-3,321	0,0016	0,0179

*DEGs em resposta ao glifosato avaliados em RT-qPCR para validação do mecanismo de resistência em biótipos de azevém resistente ao herbicida.

Recente estudo de transcriptoma com biótipos de *E. indica* (L.) Gaertn evidenciou maior número de cópias da EPSPs e aumento na expressão da glutathione S-transferase (GST) no biótipo resistente para amostras foliares coletadas 48 horas após a aplicação (CHEN et al., 2017). De maneira similar, o aumento do metabolismo em *L. rigidum* Gaudin. resistente ao herbicida diclofop-methyl foi atribuído ao aumento da expressão gênica de duas citocromos P₄₅₀ e uma glutathione transferase (GAINES et al., 2014). Além disso, as vias de regulação incluem outros subgrupos que apresentaram redução quanto ao valor de Log FC e, identificados no biótipo resistente (Tabela 6).

Ao todo, 50 DEGs down-regulated foram observadas no biótipo SVA04 onde seis DEGs estava relacionada a processos da fotossíntese (clorofila a/b) e quatro DEGs para metabolismo diferencial de carboidratos (dados não demonstrados). Em plantas, a proteína de ligação da clorofila a/b é um importante complexo de coleta da luz onde o elétron é capturado e fornecido na forma de energia de excitação para os fotossistemas, permitindo uma absorção mais eficiente (XU et al., 2012). Já, o aumento da atividade da inositol kinase em plantas de *A. thaliana* L. foi observado em resposta ao glifosato atuando como um marcador do estresse oxidativo (FOYER; NOCTOR, 2011). No entanto, as nossas principais evidências sobre o mecanismo de resistência do biótipo de azevém SVA04 ao glifosato envolvem, possivelmente, a expressão de diferentes complexos como citocromo P₄₅₀ monooxigenase glicosiltransferases, ABC transporter e peroxidases relacionadas ao não local alvo da enzima EPSPs, que serão validados em RT-qPCR (Tabela 6). Dessa forma, a validação da expressão dos genes candidatos usando a RT-qPCR em biótipos de azevém suscetível e resistente ao glifosato é fundamental para determinar o mecanismo de resistência e desenvolver estratégias de manejo.

2.3.5 RT-qPCR dos genes candidatos em resposta ao glifosato.

Os resultados sobre a eficácia das diluições do cDNA para determinação dos genes estáveis a normalização e expressão relativa (RE) dos genes alvo evidenciou que a diluição mais adequada foi 1:25 (dados não amostrados). Para os genes endógenos candidatos a referência, os valores de eficiência variaram entre 2,30 para RNA ribossomal 18s (18s) a 2,87 para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), sendo considerados adequados para estudos de RT-qPCR (Figura 11).

Para os genes alvo do transcriptoma, a eficiência variou de 1,8 para glutathiona a 2,46 para o gene EPSPs nas avaliações realizadas usando o pool de amostras dos biótipos de azevém suscetível e resistente (Tabela 3). Esses resultados prévios são essenciais para os estudos de RT-qPCR pois indicam alta precisão e confiabilidade nas análises.

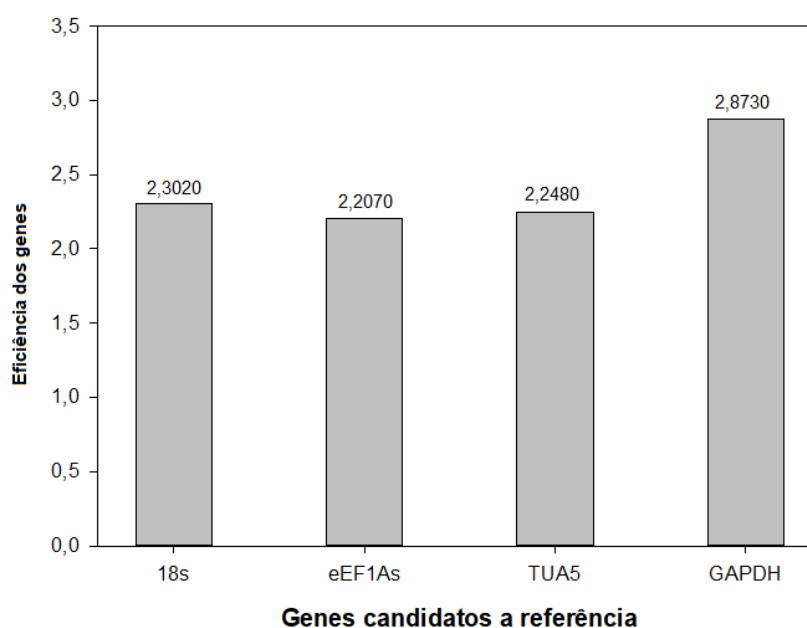


Figura 11- Eficiência dos genes candidatos a referência em biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) ao glifosato para validação em RT-qPCR. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019.

A estabilidade (valor M) dos genes candidatos a referência para os biótipos de azevém suscetível e resistente ao glifosato foi avaliada pelos softwares NormFinder, BestKeeper e GeNorm e, pelo método comparativo Δ Ct (Figura 12). Os genes de referência mais estáveis nos biótipos de azevém após análise pelo software NormFinder, foram 18s e eEF1As com valores de estabilidade de 2,202 e 3,703 (Figura 12A). Resultados similares para estabilidade destes genes foram obtidos com o software BestKeeper onde o valor M foi de 0,880 e 3,482 para 18s e eEF1As, respectivamente (Figura 12B). Ao avaliar a estabilidade pelo método comparativo Δ Ct e pelo software GeNorm, os resultados evidenciaram maior estabilidade para os genes 18s e eEF1As (Figura 12C e 12D).

O ranking geral dos melhores genes para normalização foi obtido através da combinação dos algoritmos testados (CHEN et al., 2011). Os resultados evidenciaram que 18s com valor M= 1,0 e, eEF1As, com valor M= 1,682 foram os dois genes mais estáveis para validação dos genes alvos nos biótipos de azevém

suscetível e resistente usando RT-qPCR (Figura 12E). Todavia, o gene GAPDH foi considerado o menos estável com valor de estabilidade igual a quatro. Em plantas, 18s é um RNA estrutural componente dos ribossomos citoplasmáticos de eucariotos e altamente conservados sendo altamente estável em *Solanum tuberosum* L. para o estresse salino e frio (NICOT et al., 2005).

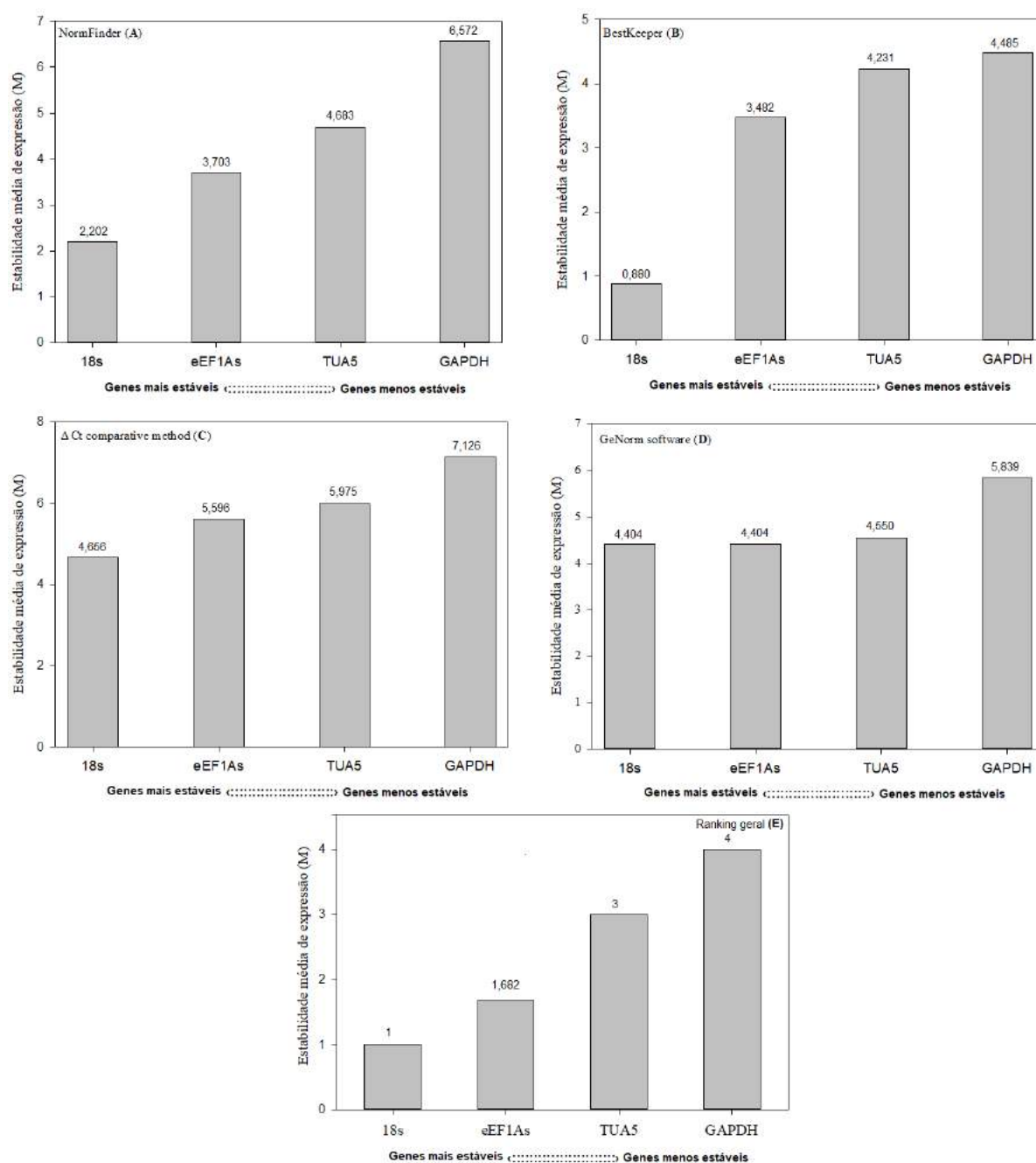


Figura 12- Estabilidade média de expressão (M) de acordo com o algoritmo NormFinder (A), BestKeeper (B), método comparativo ΔC_t (C), GeNorm software (D) e ranking geral (E) para os genes candidatos a normalização em biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) ao glifosato para validação em RT-qPCR. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.

Para o gene eEF1As, estudos reportam que esta isoforma pertencente a subunidade do complexo alfa eEF1 envolvida no alongamento de enzimas hidrolases e de proteínas actina, sendo considerado o gene mais estável em *L. perene* L. e *L. temulentum* L. para estudos com diferentes estresses abióticos (DOMBROSKI; MARTIN, 2009; LEE et al., 2010). Dessa forma, os genes candidatos a referência 18s e eEF1As foram considerados os mais estáveis e o primeiro caso relatado para validação da expressão gênica em biótipos de azevém suscetível e resistente ao glifosato a fim de avaliar o mecanismo de resistência.

Para peroxidase 1 e inositol kinase houve diminuição na expressão relativa do biótipo resistente após aplicação do glifosato e, ausência de diferenças no biótipo suscetível em resposta ao herbicida comparado ao controle (Figura 13A e 13B).

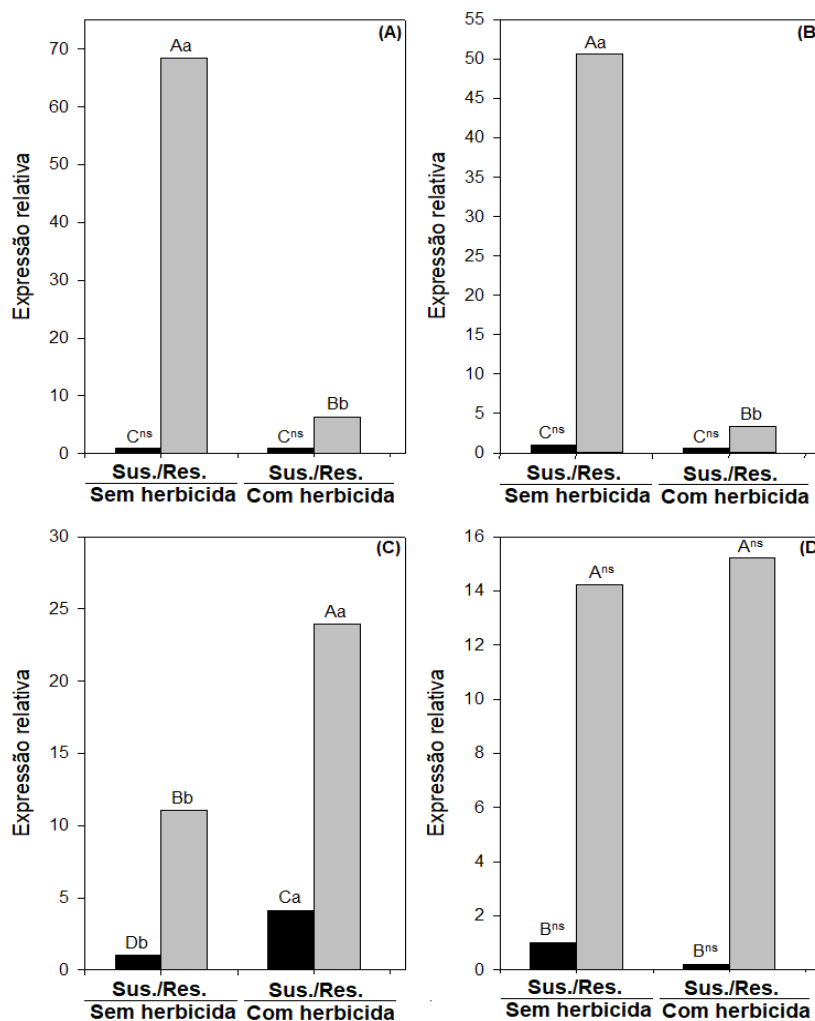


Figura 13- Expressão relativa dos genes peroxidase 1 (A), inositol kinase (B), ABC transporter (C) e CYT P₄₅₀ 71A1 (D) em resposta ao glifosato em biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04). FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019. Letra maiúscula compara o efeito do herbicida em função do controle pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$) e, letras minúsculas, compara os biótipos entre si. ^{ns}não significativo pelo teste t ($p \leq 0,05$).

Ao avaliar o gene ABC transporter família 2 houve regulação positiva após aplicação do glifosato onde os valores de RE foram de 3,8 e 23,9 no biótipo suscetível e resistente, respectivamente (Figura 13C). O envolvimento das proteínas de membrana TIP (*Tonoplast Intrinsic Protein*) e ABC transporters associadas ao sequestro vacuolar do glifosato foi reportado como mecanismo de resistência em biótipos de *C. canadensis* (NOL et al., 2012). Além disso, o aumento de expressão relativa em ambos os biótipos pode ocorrer devido o envolvimento de outras proteínas de membrana como análogos de ABC transporters que, juntamente com as TIPs, são constitutivas e podem estar envolvidas no transporte de outras moléculas conjugadas com a glutatona (PENG et al., 2010; YUAN et al., 2010). De maneira similar, a análise de RT-qPCR demonstrou que a RE do gene ABC transporter família 2 foi 50% maior em resposta ao glifosato no biótipo de azevém resistente e, 5 vezes maior quando comparado ao biótipo suscetível submetido ao herbicida (Figura 13C). Para CYT P₄₅₀ 71A1 não foi evidenciado diferença significativa no biótipo suscetível e resistente em resposta ao herbicida (Figura 13D).

Os resultados para EPSPs evidenciaram que expressão relativa foi superior a 67 vezes no biótipo suscetível submetido ao herbicida comparado ao controle sem aplicação (Figura 14A). De maneira similar, para o biótipo resistente ocorreu aumento de 8 vezes nos níveis de expressão do gene EPSPs após exposição ao glifosato na dose de 2160 g e.a. ha⁻¹ (Figura 14A). Todavia, a RE do biótipo SVA04 em relação ao SVA02 foi 8 vezes superior na ausência do herbicida, evidenciando maior expressão do gene EPSPs. Durante a síntese dos aminoácidos aromáticos, a enzima EPSPs está envolvida na formação do complexo EPSPs-S3P através da reação do chiquimato-3-fosfato (S3P) com a fosfoenolpiruvato (PEP), aumentando os níveis em plantas suscetíveis devido inibição do complexo da PEP pelo herbicida (PADGETTE et al., 1995). Entretanto, esses efeitos não foram observados no biótipo resistente ao herbicida demonstrando que a inibição da enzima não ocorreu. Para CYT P₄₅₀ 78A3 houve regulação negativa em ambos os biótipos de azevém após aplicação do glifosato comparado ao controle sem herbicida (Figura 14B).

Para glicosiltransferase houve aumento significativo nos níveis de expressão relativa com valores superiores a 400 vezes no biótipo resistente após exposição do herbicida comparado aos demais tratamentos (Figura 14C).

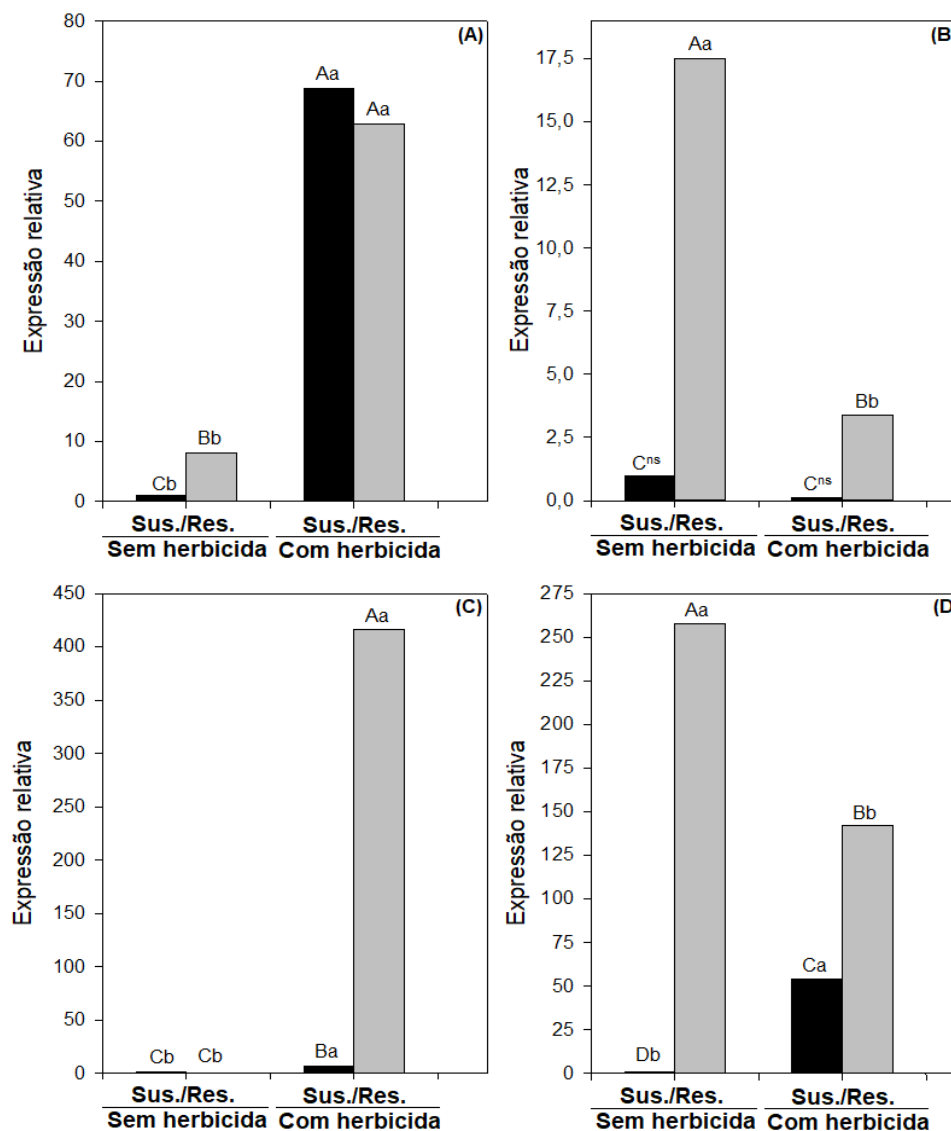


Figura 14- Expressão relativa dos genes EPSPs (A), CYT P₄₅₀ 78A3 (B), glicosiltransferase (C) e glutationa (D) em resposta ao glifosato em biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04). FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2019. Letra maiúscula compara o efeito do herbicida em função do controle pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$) e, letras minúsculas, compara os biótipos entre si. ^{ns}não significativo pelo teste t ($p \leq 0,05$).

Em plantas resistentes, as glicosiltransferases são enzimas envolvidas na detoxificação de herbicidas na fase II através da conjugação de moléculas a açúcares ou aminoácidos, tornando-as mais hidrofílicas (BOWLES et al., 2005). Para glutationa, a expressão relativa foi 50 vezes maior no biótipo suscetível após aplicação de 2160 g e.a. ha⁻¹ do glifosato comparado ao controle sem herbicida (Figura 14D). Todavia, o nível de expressão relativa no biótipo resistente foi 40% menor em resposta ao herbicida e três vezes maior quando comparado ao biótipo suscetível (Figura 14D). Em plantas resistentes, as glutations S-transferases são

enzimas multifuncionais envolvidas na conjugação de moléculas herbicidas com a glutationa (fase II), formando compostos mais polares que podem ser facilmente transportados ao vacúolo na fase III do metabolismo (YUAN et al., 2007).

Para citocromo P₄₅₀, proteína detox, ABC transporter família 4 e peroxidase 2 foram evidenciados aumentos significativos de expressão relativa no biótipo resistente (SVA04) em resposta a aplicação do herbicida glifosato comparado ao tratamento controle (SVA02) sem herbicida (Figura 15).

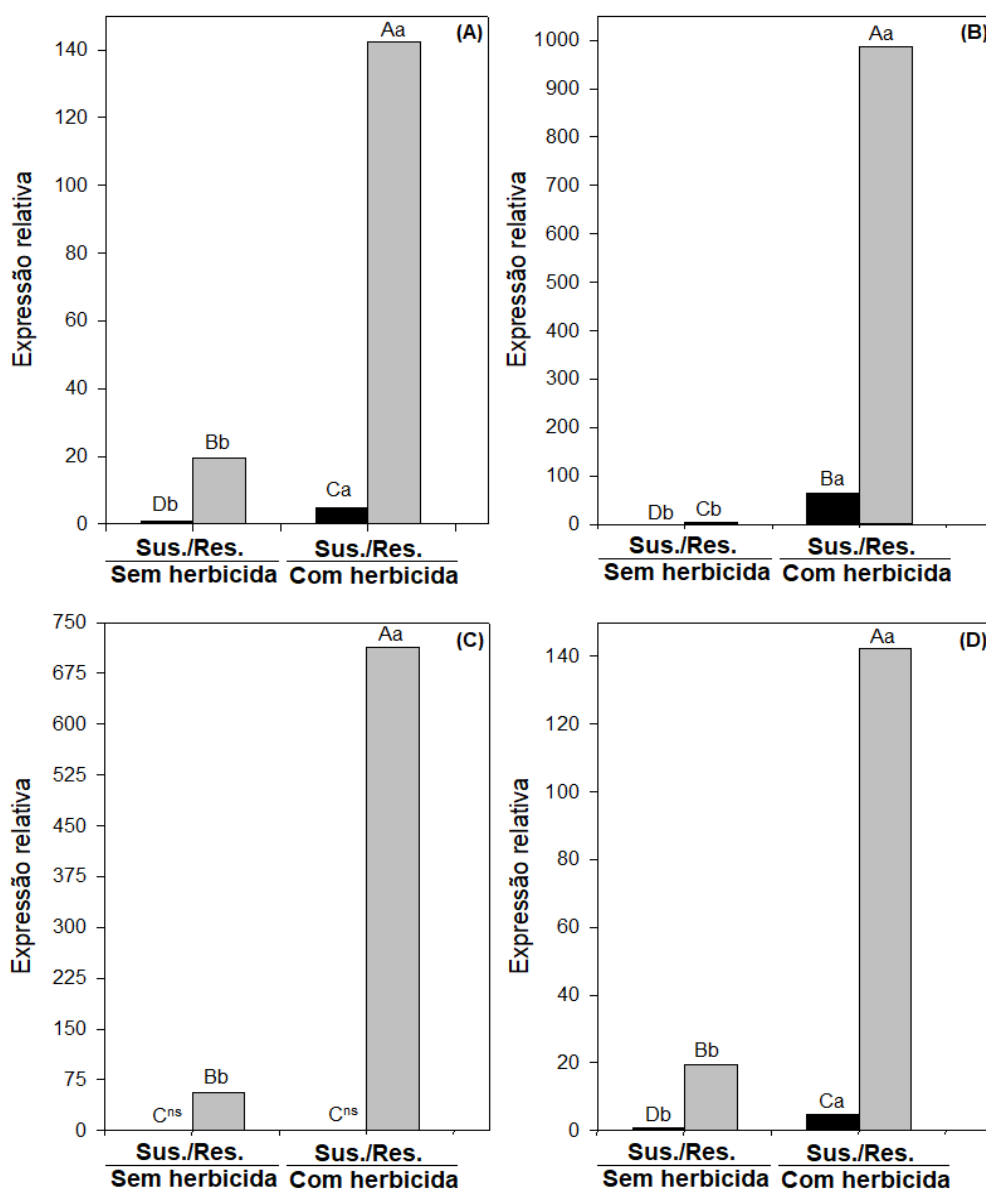


Figura 15- Expressão relativa dos genes CYT P₄₅₀ (A), proteína detox (B), ABC transporter 4 (C) e peroxidase 2 (D) em resposta ao glifosato em biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04). FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS. Letra maiúscula compara o efeito do herbicida em função do controle pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$) e, letras minúsculas, compara os biótipos entre si. ^{ns}não significativo pelo teste t ($p \leq 0,05$).

A expressão relativa para CYT P₄₅₀ e proteína detox no biótipo SVA04 após exposição do glifosato herbicida foram superiores a 280 e 986 vezes comparado a ausência do estresse herbicida, respectivamente (Figura 15A e 15B). Os resultados para os genes ABC transporter família 4 e peroxidase 2 evidenciaram valores de expressão relativa superiores a 545 e 142 no biótipo resistente em resposta ao herbicida comparado ao suscetível sem herbicida, sendo 14 e 8 vezes maiores quando comparado ao biótipo resistente na ausência do herbicida (Figura 15C e 15D). Em plantas, a citocromo P₄₅₀ pode atuar sobre diversos processos redox da detoxificação herbicida através da hidrólise ou clivagem oxidativa na fase I do metabolismo (KREUZ et al., 1996). Todavia, o metabolismo diferencial tem sido reportado para um número limitado de plantas daninhas resistentes ao glifosato, com degradação da molécula a compostos como AMPA, glioxilato e sarcosina (CARVALHO et al., 2012; GONZALEZ-TORRALVA et al., 2012a). Em plantas, as principais vias de degradação envolvem a atividade diferencial da enzima glifosato oxirredutase (GOX) que atua sobre a ligação C-N para produzir AMPA (DUKE, 2011). Todavia, o acúmulo de AMPA em plantas pode ser fitotóxico e causar efeitos sobre processos fisiológicos importantes da planta como redução nas quantidades de glicina, serina e glutamato que afetam a atividade do ácido delta aminolevulínico (ALA) e biossíntese da clorofila (REDDY et al., 2008; SERRA et al., 2013).

De maneira similar, as proteínas de detoxificação juntamente com outras enzimas detox atuam de maneira coordenada na clivagem de substâncias tóxicas durante a fase II do metabolismo e no transporte de uma membrana a outra, auxiliando na sobrevivência de plantas daninhas resistentes (YUAN et al., 2007). Além disso, as etapas de metabolismo do glifosato incluem o sequestro vacuolar em plantas após aplicação do herbicida através de transporte ativo dependente de temperatura e aumento na expressão de genes ABC transporters e suas isoformas (YUAN et al., 2010; SAMMONS; GAINES, 2014).

Para peroxidase, o aumento da expressão relativa demonstra o papel-chave na proteção contra o dano oxidativo causado pelo acúmulo de peróxido de hidrogênio em plantas submetidas ao herbicida glifosato. Em plantas suscetíveis, a inibição da EPSPs afeta a fotossíntese e quelatos de ions metálicos como ferro (Fe) e zinco (Zn) importantes para o fotossistema que favorecem o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (GOMES et al., 2014). Dessa forma, a análise de transcriptoma em biótipos de azevém suscetível e resistente ao glifosato para avaliar os genes

envolvidos em resposta ao herbicida, evidenciou regulação positiva da citocromo P450, glicosiltransferase, ABC transporter família 4 e peroxidase na resistência do biótipo SVA04 ao glifosato. Além disso, o sequenciamento genômico dos biótipos gerou um conjunto grande de informações sobre outros processos de regulação em nível molecular e fisiológico, importantes no desenvolvimento de estratégias de manejo e, considerado a primeira etapa para o uso como RNA de interferência.

2.4 Conclusões

O screening inicial demonstrou que a resistência ao glifosato ocorre em mais de 44% dos biótipos coletados do Estado do Rio Grande do Sul.

A curva dose resposta evidenciou que a GR_{50} do biótipo resistente (SVA04) e do suscetível (SVA02) foi de 2275 e 225 g e.a. ha^{-1} do herbicida glifosato, proporcionando um FR de 10,1.

O sequenciamento em plataforma Illumina HiSeq₂₅₀₀ das 12 bibliotecas gerou mais de 26,3 bilhões de pares de bases (bp) sequenciadas e 155,6 milhões de leituras montadas com comprimento médio de 311pb.

A análise de transcriptoma evidenciou que 102 e 50 genes foram regulados positivamente e negativamente no biótipo resistente (SVA04), considerados genes alvos potenciais envolvidos na resistência ao glifosato. Já para o biótipo suscetível (SVA02), foram 1623 e 1035 genes regulados positivamente e negativamente, respectivamente.

Os genes endógenos *18s* e *eEF1As* foram os mais estáveis para avaliação da expressão gênica em RT-qPCR dos biótipos de azevém suscetível e resistente submetidos a aplicação do herbicida glifosato.

A análise em RT-qPCR demonstrou que houve aumento significativo nos níveis de expressão no biótipo de azevém resistente para os genes CYT P₄₅₀, proteína detox, glicosiltransferases, ABC transporter (ABC 2 e ABC 4) e peroxidases em resposta ao herbicida glifosato aos 24 HAA.

3. CAPÍTULO II – Análise de transcriptoma em biótipos de *Lolium multiflorum* Lam. e o mecanismo de resistência ao glifosato.

3.1 Introdução

O azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) é uma planta daninha monocotiledônea de fecundação cruzada amplamente adaptada a diversas condições ambientais (KISSMANN, 2007). A espécie é facilmente encontrada na região Sul do Brasil durante o período de inverno onde causa redução significativa da produtividade em culturas como o trigo e cevada (VARGAS; ROMAN, 2005). A redução da interferência do azevém em cereais de inverno tem sido obtida através do controle químico que, alia alta eficácia e baixo custo comparado a outros métodos de controle (BUSI et al., 2013).

O glifosato é um herbicida não seletivo amplamente utilizado devido seu baixo custo, baixa toxicidade e alta eficácia sobre um espectro amplo de plantas daninhas (GREEN; OWEN, 2011). O controle do azevém com glifosato durante a dessecação é uma prática realizada pelos agricultores em diversas áreas de cultivo e, em sua maioria, sempre com o uso repetido do mesmo herbicida, situação que favoreceu o surgimento de biótipos resistentes devido a alta pressão de seleção. Nos processos de evolução da resistência, os herbicidas são agentes selecionadores de plantas daninhas resistentes pré-existent em uma determinada área, podendo ocorrer tanto em altas e baixas doses (BUSI et al., 2013). Em plantas, o glifosato é um potente inibidor da enzima 5-enol-piruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) localizada no cloroplasto, impedindo a biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, essenciais para o desenvolvimento das plantas e síntese de proteínas (DUKE; POWLES, 2008; YANNICCARI et al., 2012a).

A capacidade inerente e herdável de sobrevivência dos biótipos resistentes após a exposição do herbicida pode ocorrer devido a diferenciação genética, visto que esta característica possibilitou a introdução e colonização das plantas daninhas em diversos nichos ecológicos (AGOSTINETTO; VARGAS, 2014). No campo, a evolução da resistência envolve diversos fatores ecológicos, genéticos e agrônômicos que podem desencadear no rápido surgimento de biótipos resistentes a herbicidas. Embora complexa, a evolução da resistência requer a combinação dos fatores genéticos e das características biológicas das populações bem como do conjunto de práticas de manejo que são desenvolvidas em um determinado ambiente (POWLES; YU, 2010; GOULD; BROWN; KUZMA, 2018).

Atualmente, diversos casos de resistência de plantas daninhas a herbicidas são reportados ao redor do mundo, com custos anuais superiores a 30 bilhões de dólares considerando os efeitos da competição sobre a produtividade das culturas e o aumento nos custos para controle (GOULD; BROWN; KUZMA, 2018). Para o herbicida glifosato, são reportados mais de 300 casos de resistência, englobando 43 espécies em mais de 25 países (HEAP, 2019). No Brasil, o primeiro caso de resistência ao glifosato ocorreu em biótipos de azevém após utilização repetida do herbicida em pomares de maçã do Rio Grande do Sul (ROMAN et al., 2004). Atualmente, os problemas de resistência do azevém no Brasil aumentam em torno de 7% ao ano e, está presente em área superior a quatro milhões de hectares englobando diversas lavouras de trigo, soja e pomares (VARGAS et al., 2016).

A resistência de plantas daninhas é resultado da adaptação evolutiva de alguns indivíduos que pode ocorrer em uma ou mais etapas da ação do herbicida, incluindo desde sua absorção até o dano celular que podem causar (DÈYLE; JASIENIUK; LE CORRE, 2013). Os principais mecanismos de resistência para o herbicida glifosato incluem a redução da absorção e translocação da molécula, rápido sequestro para o vacúolo, metabolismo diferencial, mutações no local alvo e superexpressão da EPSPs (SAMMONS; GAINES, 2014), compensação e/ou proteção ao dano celular (DÈYLE; JASIENIUK; LE CORRE, 2013) e, mais recente, rápida necrose dos tecidos (HARRE; YOUNG; YOUNG, 2018). A avaliação dos mecanismos de resistência a herbicidas é considerada uma etapa importante para elaborar estratégias preventivas de manejo a fim de retardar a evolução da resistência, analisando os mecanismos relacionados ao local e não local de ação do herbicida devido a possibilidade de coexistência (AHMAD-HAMDANI et al., 2013).

Em azevém resistente ao glifosato, alguns trabalhos reportam a ocorrência de mutação para os aminoácido Prolina na posição 106 do gene EPSPs (PEREZ-JONES et al., 2007; JASIENIUK et al., 2008). Essas mutações apresentam diferenças quanto ao grau de resistência devido o decréscimo de afinidade com que causam a enzima EPSPs. Além disso, o aumento de cópias do gene como mecanismo de resistência foi verificado em populações de azevém resistente encontradas em lavouras do Arkansas (SALAS et al., 2012). A amplificação do gene oferece sítios ativos adicionais para que a fosfoenolpiruvato (PEP) e chiquimato 3-fosfato possam se ligar normalmente e, continuar a fixação de carbono (FERNÁNDEZ-MORENO et al., 2017). Outros estudos reportam que a resistência do azevém ao glifosato ocorre devido a redução da absorção e translocação com menor acúmulo de ácido chiquímico quando comparado a biótipos suscetíveis, sem que haja degradação metabólica do herbicida (MICHITTE et al., 2007; NANDULA et al., 2008). O aumento da metabolização do glifosato para compostos menos e/ou não tóxicos como ácido aminometilfosfônico (AMPA), glioxilato, sarcosina e formaldeído são descritos como mecanismo envolvendo o não local de ação (GONZALEZ-TORRALVA et al., 2014), embora não seja frequentemente reportado para plantas daninhas resistentes ao glifosato (DUKE, 2011). Outros mecanismos potenciais para o glifosato envolvem menor permeabilidade na membrana, aumento da atividade de enzimas de detoxificação como alfa-ceto redutases (VEMANNA et al., 2017) e outras do sistema antioxidante como peroxidases e catalases (MAROLI et al., 2015).

Em plantas de *Nicotiana benthamiana* Domin. (tabaco) e *A. thaliana* L., o aumento de genes homólogos da alfa-ceto redutases (AKR) reduziu a sensibilidade ao glifosato devido o menor acúmulo de ácido chiquímico e seu envolvimento em processos redox (VEMANNA et al., 2017). Em plantas de *Ambrosia trifida* L., o aumento na expressão de proteínas alfa-beta hidrolases bem como da enzima glutathione S-transferase em biótipos resistentes foram reportados como mecanismo de resistência e causadores de rápida necrose (PADMANABHAN et al., 2016). Além disso, a avaliação de enzimas do complexo antioxidante é importante na compreensão dos mecanismos de defesa e proteção de plantas submetidas a estresse. Em plantas, as principais espécies reativas de oxigênio (EROs) em nível celular capazes de causar estresse oxidativo são peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radicais hidroxila (OH[•]) e oxigênio singleto (¹O₂) (CHOUDHURY et al. 2017). O

aumento da atividade do sistema antioxidante como superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) além de antioxidantes hidrofóbicos podem ocorrer em resposta ao estresse a fim de evitar o dano oxidativo (MITTLER, 2017).

Após aplicação do herbicida em plantas, diversos processos fisiológicos são afetados e regulados através da expressão diferencial de genes e suas formas de regulação, podendo ser considerada a base principal do mecanismo de resistência envolvido em plantas daninhas resistentes (YUAN et al., 2007). Em recente estudo com biótipos de *Echinochloa colona* (L.) Link. resistente ao glifosato, os autores sugerem uma ampla abordagem com sequenciamento de transcritos a fim de identificar genes candidatos e estudos complementares para avaliar os possíveis mecanismos de resistência ao herbicida (GOH et al., 2018). De maneira similar, a complexidade das interações moleculares e ambientais requer a utilização de análises complementares, visto que as abordagens moleculares de forma isolada não explicam em sua totalidade os efeitos da resistência de plantas daninhas a herbicidas (MAROLI et al., 2018a). Dessa forma, a elucidação do mecanismo de resistência envolvido é uma estratégia importante na busca por formas e métodos capazes de auxiliar na prevenção e manejo de biótipos resistentes. O objetivo é avaliar os mecanismos de resistência em biótipos de azevém suscetível e resistente ao glifosato após análise de transcriptoma.

3.2 Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e laboratório de biologia molecular pertencentes ao CEHERB/FAEM/UFPel. Os afilhos dos biótipos de azevém selecionados para a curva de dose-resposta (SVA02 - suscetível e SVA04 - resistente) oriundos de lavouras do município de São Valentin-RS (27°35' S, 54°28' O) foram clonados vegetativamente e utilizados em todos os experimentos deste capítulo. Cada afilho foi alocado em potes com capacidade volumétrica de 0,75L contendo solo classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo e substrato GerminaPlant® na proporção 2:1.

A correção da fertilidade foi realizada previamente a mistura com o substrato, conforme as recomendações para a cultura do trigo (SBCS, 2016). A apresentação dos materiais e métodos específicos de cada experimento estão descritos abaixo.

3.2.1 Bioensaio *in vivo* para quantificação do ácido chiquímico

A condução prévia dos experimentos para o bioensaio *in vivo* foi realizada em casa de vegetação entre o período de maio a setembro de 2016. Dois experimentos foram realizados em delineamento experimental blocos completamente casualizados com quatro repetições biológicas.

O primeiro experimento foi realizado para determinar a melhor época de coleta para quantificação do ácido chiquímico. Os tratamentos foram arranjos em esquema fatorial (2 x 5), onde o fator A foi composto pelos biótipos de azevém (SVA02 e SVA04) e, o fator B, foram os tempos de coleta do material vegetal (zero, 24, 48, 96 e 192 horas após aplicação - HAA). As plantas foram submetidas a aplicação em estádio de 3-4 folhas utilizando 2160 g e.a. ha⁻¹ do glifosato (Roundup Original 360 SL, Monsanto- Brasil), máxima dose de registro (AGROFIT, 2018).

No segundo experimento, o material vegetal foi coletado com base no melhor tempo obtido no ensaio preliminar. Neste estudo, os tratamentos foram arranjos em esquema fatorial (2 x 8) cujo o fator A testou os biótipos de azevém (SVA02 e SVA04) e, o fator B, foi composto pela aplicação de oito doses do herbicida glifosato (zero, 180, 360, 720, 1440, 2880, 5760 e 11520 g e.a. ha⁻¹). O herbicida foi aplicado em estádio fenológico V₃-V₄ do azevém, com pulverizador costal pressurizado a CO₂, equipado com pontas de pulverização do tipo leque 110.02, espaçadas 50 cm entre si e calibrado para proporcionar volume de calda de 120 L ha⁻¹. As amostras foram coletadas nos tempos descritos e, armazenadas em ultrafreezer (-80°C) para posterior análise em laboratório.

A extração do ácido chiquímico do tecido foliar proveniente da 4ª folha verdadeira foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Singh e Shaner (1998), com modificações propostas por Perez-Jones et al. (2007), usando oito repetições experimentais. O ensaio *in vivo* foi realizado utilizando 50mg do tecido foliar que foi inserido em recipiente contendo 1000µL de HCl (1,25N), seguido de agitação por 1min. As amostras foram congeladas a -20°C e, posteriormente descongeladas antes de serem submetidas a banho-maria por 45min a 37°C. Duas alíquotas de 125µL de cada amostra foi adicionada em tubo contendo 1000µL do tampão de reação [ácido periódico a 0,25% (p/v) e meta-periodato de sódio a 0,25% (p/v)]. As amostras foram incubadas em banho-maria por 30min a 37°C, seguido da adição de 1000µL do tampão (0,6N de NaOH e 0,22M de Na₂SO₃). O acúmulo de

ácido chiquímico foi mensurado após resfriamento das amostras em temperatura ambiente (± 10 mm) com espectrofotômetro (Ultrospec 2000 UV/Visível), com leituras realizadas em comprimento de onda de 380nm (CROMARTIE; POLGE, 2000). A concentração de ácido chiquímico foi expressa em mg ml⁻¹ de solução e, determinada através da curva padrão obtida com diferentes concentrações de ácido chiquímico (zero, 20, 40, 60, 80 e 100mg mL⁻¹) diluídas em HCl a 1,25M.

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e, posteriormente, submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Caso seja constatada significância estatística, realizou-se análise de regressão para os fatores tempos de coleta do material vegetal e doses do glifosato enquanto que para o fator biótipos, foi realizada a comparação de médias para mensurar a dose que proporcionou 50% de acúmulo de chiquimato (I_{50}). A análise de regressão foi realizada com o auxílio do programa SigmaPlot 12.0 (SIGMAPLOT, 2012), ajustando-se os dados à equação de regressão do tipo sigmoidal, conforme proposto por Alarcón-Reverte et al. (2013):

$$y = a / [1 + \exp^{-(x - x_0)/b}]$$

onde: y = acúmulo de chiquimato em mg ml⁻¹; x = tempo da coleta ou dose do herbicida e; a , x_0 e b = parâmetros da equação em que a refere-se a diferença entre os pontos de máxima e mínima da curva, x_0 é a dose que proporciona 50% de acúmulo do chiquimato e b é a declividade da curva.

Os valores de I_{50} de cada biótipo foram obtidos a partir dos parâmetros gerados das equações das curvas e, utilizados para cálculo do fator de resistência (FR) do biótipo resistente. A comparação da I_{50} foi realizada pelo intervalo de confiança (IC de 95%) descrito no capítulo 1, referente ao estudo de curva dose-resposta.

3.2.2 Metabolismo do herbicida glifosato com inibidores da citocromo P₄₅₀

A metabolização do glifosato foi avaliada em experimento conduzido em casa de vegetação usando o delineamento experimental blocos completamente casualizado com quatro repetições biológicas. Os clones vegetativos de cada biótipo foram alocados em potes plásticos de 0,75L contendo solo e substrato GerminaPlant® na proporção de 2:1. Os tratamentos foram dispostos em esquema

fatorial utilizando os biótipos de azevém SVA02 (suscetível) e SVA04 (resistente) que foram submetidos a aplicação dos inibidores da citocromo P₄₅₀ monooxigenase malathion e butóxido de piperolina (PBO) isolados ou antecedendo o herbicida glifosato. A comparação do metabolismo diferencial foi realizada para a aplicação de glifosato isolado e testemunha sem aplicação, totalizando seis tratamentos. Os inibidores malathion e PBO, na dose de 500 e 525 g i.a. ha⁻¹, respectivamente, foram aplicados isoladamente 30 minutos antes da aplicação do herbicida glifosato na dose de 2160 g e.a. ha⁻¹ (YU et al., 2009).

As plantas foram submetidas à aplicação dos tratamentos no estágio de 3-4 folhas. A aspersão dos herbicidas e dos inibidores foi realizada com pulverizador costal pressurizado a CO₂, com ponta de pulverização do tipo leque 110.02, espaçadas a 50 cm, calibrado para aspergir 120 L ha⁻¹ de calda.

As avaliações visuais de controle foram realizadas aos 14 e 28 dias após a aplicação (DAA) e, a massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA), foi avaliada aos 28 DAA. A avaliação de controle foi realizada utilizando-se a escala percentual, onde zero (0%) representou ausência de injúrias e cem (100%) a morte das plantas (FRANS; CROWLEY, 1986). A MMSPA foi obtida pela coleta do material previamente submetido a secagem em estufa de circulação forçada de ar a 60°C por 72hs, seguido de pesagem em balança de precisão com valores transformados para g planta⁻¹.

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade (teste de Shapiro Wilk) e, posteriormente, submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Em caso de significância estatística, foi realizada a comparação de médias pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$) para os fatores biótipos e inibidores da metabolização.

3.2.3 Superexpressão e sequenciamento do gene EPSPs

O experimento foi conduzido em laboratório de biologia molecular usando material vegetal oriundo de clones vegetativos dos biótipos de azevém, com três repetições. O RNA total foi extraído a partir de ± 100 mg de folhas usando o reagente Trizol (Invitrogen-USA) de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do RNA extraído foi determinada em eletroforese com gel de agarose a 2% (p/v) e, a quantidade e qualidade de RNA foi mensurada em eletroforese com gel de agarose

a 1% (p/v) e nanofotômetro (NanoDrop™ 2000 - Thermo Scientific) com razões de absorvância de 260/280nm e 260/230nm.

O cDNA foi sequenciado em plataforma Illumina HiSeq₂₅₀₀ e os transcritos foram usados para a montagem do *de novo* transcriptoma. A RT-qPCR foi utilizada para quantificar o número de cópias genômicas da EPSPs dos biótipos de azevém em relação ao número de cópias genômicas da cinamol-CoA redutase (CCR). Os primers forward e reverse da EPSPs (**F-GCCGAGGAAACAATCAACAT** e **R-GCAGGTTTCCGATTGAGAAG**) e da CCR (**F-CACAGGAGCAGTCAGGGG** e **R-CCCGGTCACCTCCAAGTAC**) foram obtidos do transcriptoma.

A reação de amplificação foi realizada em LightCycler 480 System, conforme protocolo já descrito. As triplicatas foram submetidas a incubação com 6,25µL do reagente LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Applied Science), 0,5µL dos primers forward e reverse (10mM), 1µL cDNA (0,2µg) e 4,25µL de água DEPC, totalizando 12,5µL da reação. O aumento no número de cópias da EPSPs para cada biótipo sem aplicação do herbicida foi obtido pelo valor de $RE=2^{-(\Delta\Delta CT)}$ onde ΔCt refere-se a diferença entre Ct_{EPSPs} e Ct_{CCR} (GAINES et al., 2010). Os resultados foram submetidos a análise de variância ($p \leq 0,05$) e, as médias comparadas pelo teste t ($p \leq 0,05$).

As sequências da EPSPs dos biótipos de azevém suscetível e resistente obtidas do transcriptoma foram submetidas a análise dos quadros de leituras abertos, usando o programa online ORFfinder. O programa é usado para tradução da proteína e identificação de todos os quadros de leituras da sequência que contém trechos contínuos de códons (ORF). As ORFs compreendendo todo o gene EPSPs dos biótipos de azevém suscetível e resistente foram alinhadas pelo programa BioEdit Sequence Alignment Editor Versão 7.2.6 (HALL, 1999). A ocorrência de mutações do gene foi comparada com as sequências da EPSPs de *A. thaliana* (L.) Hevnh (GenBank: CAA29828.1), *Lolium multiflorum* Lam. (GenBank: DQ153168.2) e *Zea mays* L. (GenBank: AF349754) depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

3.2.4 Atividade de enzimas antioxidantes

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao CEHERB/FAEM da Universidade Federal de Pelotas, durante o período de julho a

setembro de 2017, em delineamento experimental de blocos completamente casualizados com quatro repetições biológicas. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial (2 x 5) onde o fator A foram os biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) e, o fator B, foram os tempos de coleta (zero, 24, 48, 96 e 192 horas após a aplicação) para avaliação das enzimas antioxidantes em resposta ao glifosato.

O herbicida foi aplicado na dose de 2160 g e.a. ha⁻¹ com pulverizador costal pressurizado com CO₂, equipado com quatro pontas do tipo TTI 110.15, espaçadas a 0,5m e calibrado para aplicar 120L ha⁻¹ de calda. As enzimas antioxidantes avaliadas foram ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) nos tempos pré-determinados.

As enzimas antioxidantes APX, SOD e CAT foram avaliadas em 200mg de amostras oriundas de folhas moídas até pó fino em almofariz de porcelana na presença de nitrogênio líquido e 0,02g de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Ao material macerado foi adicionado 1,5mL da solução tampão (pH=7,8) composto por 100mM de fosfato de potássio, 0,1mM de EDTA e 20mM de iodo ascórbico e água ultrapura. A solução mista (amostra + tampão) foi centrifugada a 14000rpm por 20min a 4°C.

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método adaptado de Peixoto et al. (1999), na qual baseia-se na inibição da redução do nitro azul de tetrazólio (NBT) pelo extrato enzimático envolvido na formação de cromóforo. Neste ensaio, uma unidade de atividade enzimática (UA) da SOD foi considerada como a quantidade de enzima necessária para obter 50% de inibição da redução do NBT pela SOD contida no extrato enzimático. Para a reação, 20µL da amostra foi submetida a 1mL do tampão fosfato de potássio a 100 mM (pH=7,8), 400µL de 70mM de metionina, 20µL de EDTA a 10mM, 390µL de água ultrapura, 150µL de 1mM de NBT e 20µL de riboflavina a 0,2mM, totalizando 2mL da mistura. Após isso, os tubos foram expostos a uma câmara fechada com lâmpada fluorescente de 15W por 10min e, a absorbância, lida em espectrofotômetro a 560nm. A amostra controle foi composta por tubos sem extrato expostos ou não à luz. A atividade foi determinada pelo cálculo da quantidade de extrato que inibiu 50% da reação NBT e expressa em UA mg⁻¹ min⁻¹.

Para APX, a atividade foi determinada pelo consumo de H₂O₂ (coeficiente de extinção de 2,9mM cm⁻¹). A incubação foi realizada em tampão fosfato de potássio a

200 mM (pH=7,8) com 100 μ L de 0,5mM de ácido ascórbico a 10mM e 780 μ L de água ultrapura que foi submetida a banho maria a 28°C por 30min. A absorbância foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 290nm por 90 segundos, com leituras realizadas em intervalos de sete segundos. A atividade da CAT foi determinada pelo consumo de H₂O₂ (coeficiente de extinção de 39,4mM cm⁻¹). A mistura para reação foi composta de 1mL do tampão fosfato de potássio a 200 mM (pH=7,0), 880 μ L de água ultrapura, 100 μ L de peróxido de hidrogênio a 250mM e 20 μ L do extrato. A absorbância foi lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 240nm por 90 segundos, com leituras realizadas em intervalos de sete segundos (SUDHAKAR; LAKSHMI; GIRIDARAKUMAR, 2001). O cálculo da atividade da CAT e da APX foi considerado em função do decréscimo de uma unidade de absorbância e, os valores foram expressos em UA mg⁻¹ min⁻¹.

O dano celular nos tecidos foi determinado pelo conteúdo de H₂O₂ e TBARs via acúmulo de malonilaldeído (MDA) (HEATH; PACKER, 1968). As análises foram avaliadas utilizando 0,2g do tecido foliar moídos em pistilo com nitrogênio líquido, homogeneizados em 2mL de ácido tricloroacético a 0,1% (p/v) e centrifugados a 14000 rpm por 20min. Após isso, foi adicionado 0,2mL do sobrenadante a 0,8mL do tampão fosfato 10mM (pH=7,0) e 1mL de iodeto de potássio a 1M. A solução foi mantida por 10min a temperatura ambiente e a absorbância lida a 390nm. A quantificação de H₂O₂ foi avaliada em função da concentração de H₂O₂ determinado através da curva padrão com valores expressos em mmol g⁻¹ de massa fresca.

A determinação de TBARs foi realizada com alíquotas de 0,5mL do sobrenadante após adição em 1,5mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,5% (p/v) e ácido tricloroacético 10% (p/v), seguido de incubação a 90°C por 20min. A reação foi interrompida em gelo por 10min e a absorbância lida a 532nm, descontando-se a absorbância não específica a 600nm. Os dados obtidos foram analisados quanto a normalidade (teste Shapiro-Wilk), posteriormente submetidos a análise de variância (p \leq 0,05) e, em caso de significância estatística, as médias foram comparadas através de análise de regressão para os fatores tempos de coleta.

3.3 Resultados e discussão

A apresentação dos resultados e discussão de cada experimento estão descritos abaixo, seguindo a sequência descrita nos materiais e métodos.

3.3.1 Bioensaio *in vivo* para quantificação do ácido chiquímico

A análise de variância evidenciou efeito significativo para acúmulo do ácido chiquímico entre os biótipos de azevém e tempos de amostragem bem como para as doses do herbicida glifosato, com ajuste satisfatório dos dados ao modelo de regressão sigmoidal, considerando os valores do coeficiente de determinação (R^2) superiores a 0,85 em todas as curvas (Figura 16 e 17).

A avaliação dos níveis basais do chiquimato antes da aplicação do glifosato na dose de 2160 g e.a. ha⁻¹ nos biótipos de azevém suscetível e resistente evidenciou valores médios de 9,45mg mL⁻¹, sendo estatisticamente iguais (Figura 16). Resultados similares foram encontrados para o acúmulo de ácido chiquímico em plantas suscetíveis e resistentes de *L. multiflorum* Lam., previamente ao tratamento com glifosato (JASIENIUK et al., 2008).

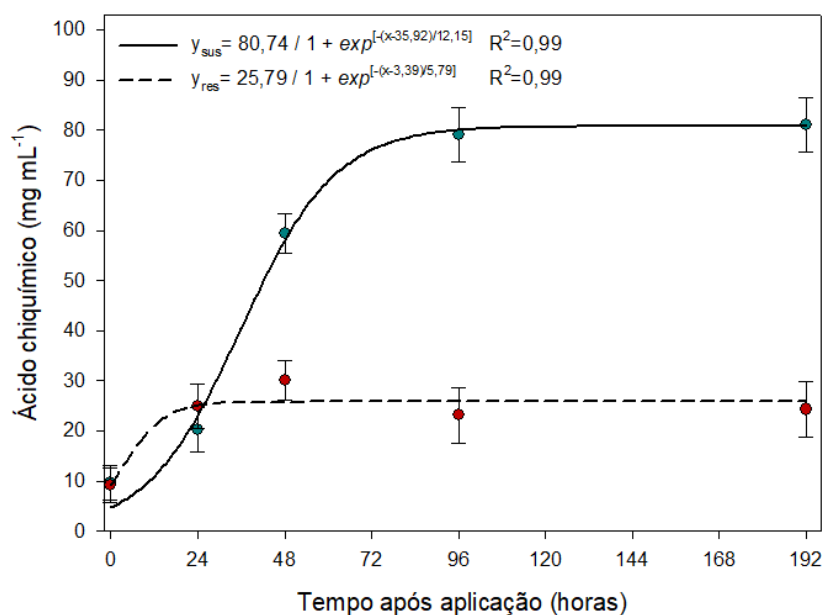


Figura 16- Acúmulo de ácido chiquímico (mg mL⁻¹) em biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) avaliado nos tempos zero, 24, 48, 96 e 192 horas após aplicação do herbicida glifosato na dose de 2160g ea. ha⁻¹. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2019. Os pontos representam os valores médios das repetições e as barras, os respectivos intervalos de confiança da média de cada tempo.

Para as avaliações realizadas após a aplicação do herbicida, os resultados demonstraram que o acúmulo máximo de ácido chiquímico nos biótipos suscetível e resistente foi de 81,06 e 30,10 mg mL⁻¹ que ocorreu 192 e 48 HAA, respectivamente (Figura 16). O menor acúmulo de chiquimato observado no biótipo resistente

comparado ao suscetível pode ocasionar menor inibição da enzima EPSPs, evidenciando a necessidade de doses maiores do herbicida glifosato para proporcionar níveis semelhantes de controle. Resultados similares foram reportados em plantas suscetíveis de *E. colona* (L.) Link. e *L. rigidum* Gaudin. onde o acúmulo de chiquimato foi duas vezes maior comparado as plantas resistentes ao glifosato (ALARCÓN-REVERTE et al., 2013; FERNÁNDEZ-MORENO et al., 2017).

Para a avaliação realizada 24 HAT com glifosato, o acúmulo do ácido chiquímico não diferiu estatisticamente entre os biótipos, evidenciando que na fase inicial de ação do herbicida os processos de absorção e translocação estão ocorrendo de forma similar (Figura 16). Todavia, os resultados evidenciaram que o acúmulo de chiquimato no biótipo resistente não aumentou nos demais períodos avaliados quando comparado ao biótipo suscetível onde os níveis basais foram 320% superior na avaliação aos 96 HAT (Figura 16). Resultados similares foram encontrados em *L. rigidum* Gaudin. resistente ao glifosato onde o acúmulo de chiquimato entre biótipos suscetível e resistente não diferiu estatisticamente na avaliação 24HAT e, foi 250% superior no suscetível para análise realizada 96HAT (FERNÁNDEZ-MORENO et al., 2017). De maneira similar, em *L. perene* L. o acúmulo de ácido chiquímico foi menor para biótipos resistentes ao glifosato aos 72 HAT (YANNICCARI et al., 2012b). Elevado acúmulo de ácido chiquímico resulta em maior inibição da enzima EPSPs em plantas e redução nos valores de C_{50} e GR_{50} (GAINES et al., 2010; FERNANDEZ et al., 2015). A redução no acúmulo de chiquimato pode indicar absorção e/ou translocação do glifosato mais lenta (POWLES; PRESTON, 2006). Além disso, o herbicida não é totalmente excluído do local alvo devido a presença do ácido chiquímico na enzima alvo, indicando que EPSPs pode ser parcialmente inibida pelo herbicida (PEREZ-JONES et al., 2007).

Ao avaliar o acúmulo de ácido chiquímico nos biótipos de azevém suscetível e resistente submetidos a diferentes doses do herbicida glifosato, os resultados evidenciaram maior acúmulo no biótipo suscetível independente da dose utilizada comparado ao biótipo resistente (Figura 17). Em *A. palmeri* S. Wats, independentemente da dose de glifosato, o acúmulo de chiquimato em plantas suscetíveis foi maior comparado aos resistentes (MOHSENI-MOGHADAM; SCHROEDER; ASHIGH, 2013). Para a dose de 720 e 1440 g e.a. ha^{-1} do glifosato, o acúmulo de chiquimato foi 252 e 173% menor no biótipo resistente, respectivamente.

Todavia, os níveis de chiquimato para doses de superiores a 5160 g e.a. ha⁻¹ foi apenas 17% menor no biótipo resistente.

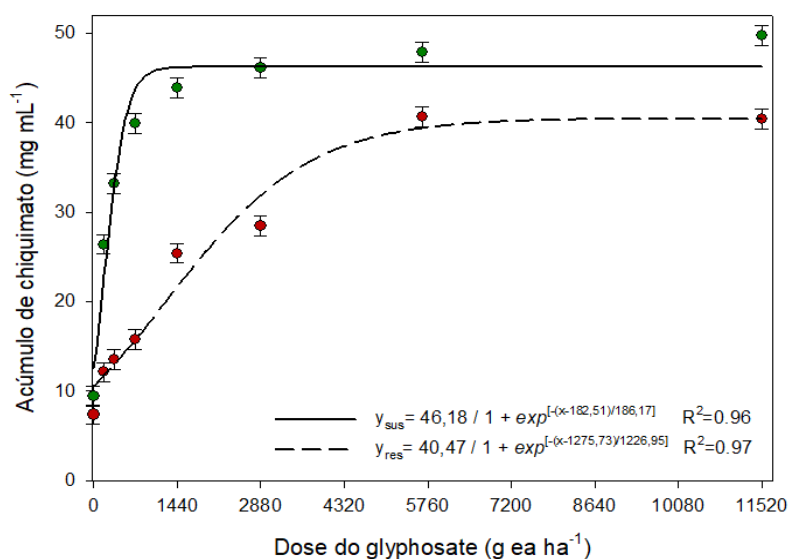


Figura 17- Acúmulo de ácido chiquímico (mg mL⁻¹) em biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) em função de diferentes doses do herbicida glifosato avaliado 48 horas após aplicação. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019. Os pontos representam os valores médios das repetições e, as barras, os respectivos intervalos de confiança da média de cada tempo.

Tabela 7- Valores de I₅₀ com o intervalo de confiança (IC de 95%) e fator de resistência (FR) de biótipos de azevém suscetível e resistente submetidos a diferentes doses do glifosato. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.

Biótipos	I ₅₀ ¹		Fator de resistência ² (FR)
	g e.a. ha ⁻¹	IC 95%	
Suscetível (SVA02)	182,5	163,17 - 201,85	-
Resistente (SVA04)	1275,73	1153,40 - 1398,06	7,0

¹I₅₀ = dose necessária para inibir 50% o acúmulo de chiquimato.

²FR obtido pela divisão do valor I₅₀ do resistente pelo I₅₀ do biótipo suscetível.

Os resultados evidenciam a necessidade de doses maiores para que os níveis de chiquimato sejam similares entre biótipos suscetíveis e resistentes, visto que I₅₀ foi de 182,5 e 1275,7, respectivamente, resultando em FR de sete vezes ao comparar os valores de I₅₀ (Tabela 7). Com base nos valores de I₅₀ para acúmulo de chiquimato, populações resistentes de *E. colona* L. e *E. indica* (L.) ao glifosato apresentaram valores quatro a oito vezes menores comparado a plantas suscetíveis (ALARCÓN-REVERTE et al., 2013; MOLIN; WRIGHT; NANDULA, 2013).

Altos níveis de resistência ao glifosato aliados e ao menor acúmulo de ácido chiquímico em biótipos resistentes pode resultar do envolvimento de mais de um mecanismo de resistência (não local e/ou local alvo de ação), como já demonstrado em espécies gramíneas de plantas daninhas (MICHITTE et al., 2007; CARVALHO et al., 2012; FERNANDEZ et al., 2015). Resultados recentes obtidos para biótipos de *L. rigidum* Gaudin. coletados em campos de oliveira reportaram que a resistência ao glifosato envolvia menor absorção da molécula seguido de redução no acúmulo de chiquimato e aumento da metabolização do glifosato (FERNÁNDEZ-MORENO et al., 2017). Dessa forma, compreender os processos bioquímicos e fisiológicos bem como os demais possíveis mecanismos que ocorrem em biótipos de azevém resistentes e suscetíveis ao glifosato são importantes no sentido de desenvolver estratégias eficazes para manejo da resistência aos herbicidas.

3.3.2 Metabolismo do herbicida glifosato com inibidores da citocromo P₄₅₀

A análise de variância evidenciou interação significativa entre os fatores para todas as épocas avaliadas e para a massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) (Tabela 8). O herbicida glifosato aplicado de forma isolada ou associado aos inibidores malathion ou PBO proporcionaram controle acima de 97% aos 14 DAA no biótipo suscetível. Ao comparar o controle no biótipo resistente, foi observado fitotoxicidade de 56% para aplicação isolado do herbicida, não diferindo estatisticamente dos valores obtidos para o uso associado do glifosato com os inibidores da citocromo P₄₅₀ monooxigenase aos 14 DAA (Tabela 8).

Em plantas, estas enzimas estão envolvidas em diversas funções fisiológicas onde são as principais responsáveis na metabolização de xenobióticos através de reações redox, conferindo seletividade ou tolerância a herbicidas (POWLES; YU, 2010). Resultado similar foi reportado aos 28 DAA, onde os níveis de controle foram estatisticamente semelhantes no biótipo resistente submetido a aplicação do glifosato isolado ou associado aos inibidores malathion e PBO (Tabela 8). Em plantas, o malathion está envolvido na liberação do enxofre da P₄₅₀, inibindo sua ação nos processos de detoxificação (WERCK-REICHHART; HEHN; DIDIERJEAN, 2000) enquanto que o PBO atua no metabolismo oxidativo do grupo metileno da citocromo P₄₅₀, levando a formação de carbono e de um complexo irreversível com grupo heme-ferro da enzima P₄₅₀ (FEYEREISEN, 1999).

Tabela 8- Controle (%) aos 14 e 28 dias após aplicação (DAA) e massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA em gramas planta⁻¹) de biótipos azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) submetidos à aplicação de herbicida glifosato isolado ou antecedido em trinta minutos da aplicação dos inibidores do citocromo P₄₅₀ monooxigenase (malathion e PBO) e testemunha sem aplicação. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.

Tratamento	14 DAA	
	Suscetível (SVA02)	Resistente (SVA04)
Malathion	2,7 Ba	0,7 Ba
PBO	2,3 Ba	0,0 Ba
Glifosato	98 Aa	56 Ab
Glifosato+Malathion	99 Aa	52 Ab
Glifosato+PBO	98 Aa	55 Ab
Controle	0,0 Ba	0,0 Ba
C.V. (%)	11,54	
Tratamento	28 DAA	
	Suscetível (SVA02)	Resistente (SVA04)
Malathion	0,2 Ba	0,0 Ca
PBO	0,4 Ba	0,0 Ca
Glifosato	100 Aa	59 Bb
Glifosato+Malathion	100 Aa	71 Ab
Glifosato+PBO	100 Aa	74 Ab
Controle	0,0 Ba	0,0 Ca
C.V. (%)	8,76	
Tratamento	MMSPA (g planta ⁻¹)	
	Suscetível (SVA02)	Resistente (SVA04)
Malathion	1,78 Ab	2,15 Aa
PBO	1,76 Ab	2,10 Aa
Glifosato	0,22 Bb	0,82 Ba
Glifosato+Malathion	0,20 Ba	0,31 Ca
Glifosato+PBO	0,21 Ba	0,33 Ca
Controle	1,85 Ab	2,12 Aa
C.V. (%)	14,07	

*médias seguidas de mesma letra minúscula (na linha) e de mesma letra maiúscula (na coluna) não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). ^{ns}= não significativo ($p \leq 0,05$).

Como já evidenciado para o acúmulo de chiquimato, estes resultados demonstraram que há inibição parcial da enzima mesmo para a aplicação isolada do glifosato. Todavia, o uso de inibidores potencializou a ação do herbicida conforme foi evidenciado para a MMSPA onde o uso do glifosato com malathion ou PBO reduziu em mais de 80% a massa seca e mais de 50% quando comparado ao uso isolado do herbicida (Tabela 8). Diversos estudos relatam o papel do citocromo P₄₅₀ como mecanismo de resistência em resposta a herbicidas devido a detoxificação através da clivagem de moléculas usando elétrons do NADPH como agente redutor (DÉYLE, 2013; GAINES et al., 2014; DUHOUX et al., 2015).

Para o glifosato, a metabolização do herbicida para compostos não e/ou menos tóxicos é pouco reportada como mecanismo de resistência e, inclui a transformação da molécula para metabólitos como AMPA, glioxilato, sarcosina e formaldeído (DUKE et al., 2011; GONZALEZ-TORRALVA et al., 2014). Resultados encontrados em *L. rigidum* Gaudin. (FERNÁNDEZ-MORENO et al., 2017) *Conyza canadensis* (L.) Cronq. (GONZALEZ-TORRALVA et al., 2012a), *Sorghum halepense* L. (CARVALHO et al., 2012) e *Parthenium hysterophorus* L. (BRACAMONTE et al., 2016) reportaram aumento do metabolismo ao glifosato a compostos não tóxicos como mecanismo de resistência com produção de AMPA como principal metabólito e com níveis até nove vezes maiores em biótipos resistentes.

O aumento do metabolismo do glifosato pode ocorrer através da ação de outras enzimas de detoxificação como glycosyltransferases, glutathione-S-transferase e ABC transportadores que estão envolvidas na transformação da molécula ou sequestro para locais não alvo da enzima (YUAN et al., 2007; DÉLYE, 2013). Em biótipos de *C. canadensis* (L.) Cronq. resistente ao glifosato foi observado rápido sequestro ao vacúolo (<24HAA) como mecanismo de resistência onde houve superexpressão de ABC transportadores que reduziram o transporte via floema do herbicida (GE et al., 2011). De maneira similar, os resultados do transcriptoma evidenciaram aumento na expressão relativa de ABC transportadores para o biótipo de azevém resistente, demonstrando a possibilidade de haver compartimentalização do glifosato no vacúolo. Os níveis de controle e de redução de MMSPA observados nesse estudo indicam um possível envolvimento dos complexos enzimáticos da P₄₅₀ na resistência de azevém ao herbicida glifosato, comprovando parcialmente a hipótese que há mais de um mecanismo de resistência envolvido.

3.3.3 Superexpressão e sequenciamento do gene EPSPs

A análise em RT-qPCR quanto ao número de cópias da EPSPs dos biótipos suscetível e resistente em relação a CCR não evidenciou superexpressão da EPSPs (Figura 18). No entanto, a ocorrência de superexpressão da EPSPs ocasiona elevado nível de resistência e, considerado um dos principais mecanismos envolvidos na sobrevivência de plantas daninhas resistentes ao glifosato (SALAS et al., 2012; SAMMONS; GAINES, 2014; CHEN et al., 2015).

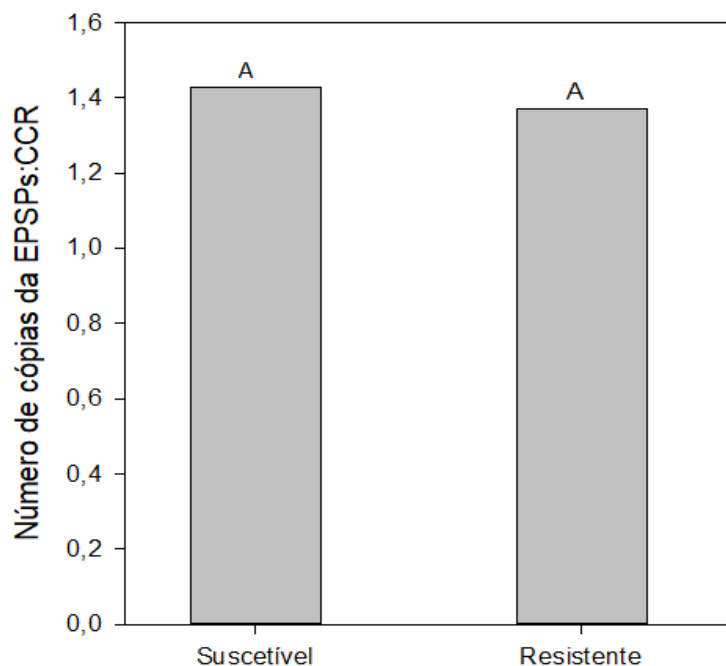


Figura 18- Número de cópias da EPSPs:CCR dos biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) ao herbicida glifosato. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.

Um fragmento com 1168 e 1101pb do gene EPSPs englobando todas as regiões conservadas foi obtido a partir do RNA dos biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) ao herbicida glifosato. A região sequenciada incluiu os domínios conservados do gene EPSPs onde foram reportados pontos de mutação em biótipos de *L. multiflorum* Lam. e *L. rigidum* Gaudin. resistentes a herbicidas inibidores da EPSPs (GAINES; HEAP, 2018). A sequência parcial da EPSPs nos biótipos de azevém suscetível e resistente (SVA02 e SVA04) não evidenciou mutações da Tirosina e Prolina nas posições 102 (Thr-102) e 106 (Pro-106) do gene, respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9- Sequência parcial do gene EPSPs dos biótipos de *L. multiflorum* Lam. suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) ao herbicida glifosato. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019.

Posição	100	101	102	103	105	106	107	...	366	367	368
Sequência	GCT	GGA	ACT	GCG	CGG	CCA	TTG	...	CAT	TGC	GAT
Tradução	A	G	T	A	R	P	L	-	I	C	T
<i>A. thaliana</i> ¹	A	G	T	A	R	P	L	-	I	C	T
<i>L. multiflorum</i> ²	A	G	T	A	R	P	L	-	I	C	T
Suscetível	A	G	T	A	R	P	L	-	I	C	T
Resistente	A	G	T	A	R	P	L	-	I	R	T
<i>Z. mays</i> ³	A	G	T	A	R	P	L	-	I	R	T

¹Sequência da EPSPs em *Arabidopsis thaliana* (GenBank: CAA29828.1); ² Sequência da EPSPs em *Lolium multiflorum* (GenBank: DQ153168.2); ³Sequência da EPSPs em *Zea mays* (GenBank: AF349754). As letras dentro da tabela referem-se a tradução dos aminoácidos Alanina (A), Glicina (G), Treonina (T), Metionina (M), Arginina (R), Leucina (L), Isoleucina (I) e Cisteína (C).

Em plantas daninhas resistentes ao glifosato, a ocorrência das mutações Thr₁₀₂ por Isoleucina em *E. indica* (L.) Gaertn. e na Pro₁₀₆ por Treonina, Serina, Leucina ou Alanina tendem a causar moderado nível de resistência ao herbicida (GAINES; HEAP, 2018; SAMMONS; GAINES, 2014). Resultado similar foi encontrado para *L. multiflorum* Lam. resistentes ao glifosato oriundo de lavouras da Espanha onde a substituição do aminoácido Prolina para Serina (Pro₁₀₆-Ser) do gene da EPSPs juntamente com a menor translocação do herbicida, conferiu moderado nível de resistência (FR<5) em todos os biótipos resistentes avaliados (GONZALEZ-TORRALVA et al., 2012b). Todavia, em recente estudo com biótipos de *E. indica* (L.) Gaertn. foi reportado que a substituição dupla de aminoácidos nas posições Thr₁₀₂ e Pro₁₀₆ (TIPS) para Isoleucina e Serina conferindo elevado grau de resistência ao herbicida glifosato (YU et al., 2015).

Mutações de ponto afetam a conformação estrutural do gene EPSPs e o acoplamento do herbicida devido a redução da afinidade da enzima com a porção fosfatada do glifosato e menor interação com as forças hidrofóbicas existentes entre o fosfoenolpiruvato (PEP) e herbicida (PRIESTMAN et al., 2005). A redução da afinidade da PEP foi demonstrada através de experimentos *in vivo* com biótipos de *E. indica* (L.) Gaertn. onde as mutações TIPS acarretaram em elevado nível de resistência (YU et al., 2015). Além disso, a sequência analisada da EPSPs evidenciou alteração de aminoácido Cisteína por Arginina na posição 367 (Cys₃₆₇Arg) do gene no biótipo resistente devido a troca do códon TGC para CGT comparado ao biótipo suscetível e alinhamento com as sequências de *L. multiflorum* Lam. e *A. thaliana* L. (Tabela 9).

Estruturalmente, a cisteína é um aminoácido polar encontrada em proteínas e na glutatona onde difere da arginina pela presença de um grupo tiol na cadeia lateral que possui caráter nucleofílico e, importantes na estabilidade celular e resistência a proteólise (BURNS; OLSZOWY; CIBOROWSKI, 2016). Todavia, a ocorrência do aminoácido Arginina na posição 367 do gene corrobora com a sequência da EPSPs alinhada em *Zea mays* L. (Tabela 9). Resultados similares foram obtidos para o alinhamento de *L. multiflorum* Lam. de populações do Arkansas-EUA onde foi encontrada uma mutação Cys₃₆₇Arg no biótipo resistente e suscetível, indicando não conferir resistência ao glifosato (SALAS et al., 2012).

3.3.4 Atividade das enzimas antioxidantes

Os resultados não demonstraram a necessidade de transformação dos dados e, a análise de variância evidenciou efeito significativo para as enzimas antioxidantes APX, CAT, SOD, H₂O₂ e TBARs entre os fatores biótipos de azevém suscetível e resistente submetidos ao glifosato e tempos de amostragem (Figura 19, 20 e 21). Recentemente, a proteção contra os danos oxidativos subsequentes à ação do herbicida também pode desempenhar um papel importante como mecanismo de resistência de plantas daninhas a herbicidas relacionados ao não local alvo de ação (DÉYLE et al., 2013). O papel das enzimas antioxidantes em situações de estresse é controlar o acúmulo de EROs e limitar o dano oxidativo (SHARMA et al., 2012).

Para APX, a atividade da enzima após exposição ao glifosato foi 50 vezes superior no biótipo resistente aos 24HAA e 100 vezes maior na avaliação realizada 48 HAA quando comparado com o biótipo suscetível (Figura 19A). Para atividade da enzima catalase, os resultados demonstraram comportamento similar entre os biótipos nas avaliações realizadas até 96HAA (Figura 19B). Todavia, a atividade da catalase no biótipo resistente (SVA04) foi 60% superior aos 192HAA comparado ao biótipo suscetível (Figura 19B).

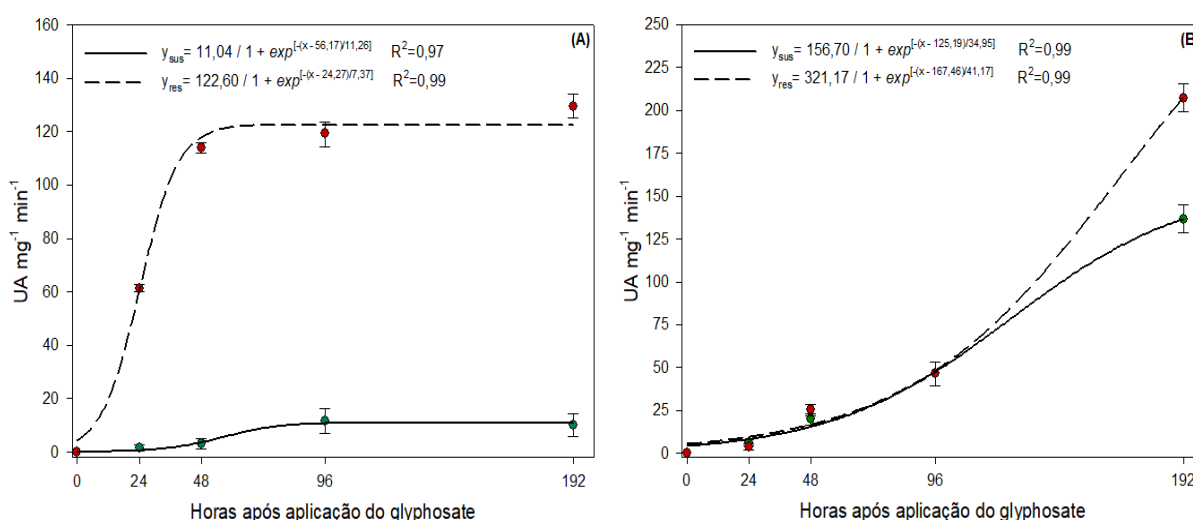


Figura 19- Atividade das enzimas antioxidantes APX (A) e CAT (B) nos biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) em resposta ao herbicida glifosato na dose de 2160 g ea. ha⁻¹ avaliado em diferentes tempos após aplicação. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019. Os pontos representam os valores médios das repetições e, as barras, são os respectivos intervalos de confiança da média dos tratamentos no tempo ($p < 0,05$).

Em plantas expostas a estresse, a APX possui várias isoformas enzimáticas de regulação encontradas no citosol, mitocôndrias, peroxissomos, cloroplastos e parede celular atuando na detoxificação do peróxido de hidrogênio usando ascorbato como substrato (DABROWSKA et al., 2007; BHATT; TRIPATHI, 2011). Resultados recentes em plantas de trigo e arroz evidenciaram aumento da atividade de enzimas APX e catalase após exposição a herbicidas (AGOSTINETTO et al., 2016; 2019). Além disso, a inibição da enzima EPSPs em plantas suscetíveis causa o bloqueio da biossíntese de aminoácidos e afeta demais processos fisiológicos através da produção de EROs que causam danos celulares e morte de plantas.

A neutralização de moléculas citotóxicas geradas pela ação de herbicidas foi constatada em biótipos resistentes de *Ambrosia myosuroides* Huds. para herbicidas inibidores da enzima acetil-CoA carboxilase (ACCase) onde houve aumento significativo para atividade de peroxidases, conferindo proteção contra o dano oxidativo (CUMMINS; BRYANT; EDWARDS, 2009). A conversão do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água pela enzima catalase envolve a presença de um grupo heme no sítio ativo, que impede a formação do radical hidroxila e outros compostos tóxicos produzidos na fotorrespiração e β -oxidação de ácidos graxos. Em plantas superiores, a catalase está localizada nos peroxissomos, mitocôndrias, citosol e cloroplasto sendo considerada uma das enzimas mais efetivas na degradação de altas concentrações de H_2O_2 devido a alta afinidade com o substrato a fim de manter o nível basal atóxico (MHAMDI et al., 2010).

Para a enzima SOD, os resultados nos biótipos de azevém suscetível e resistente após aplicação do glifosato, evidenciaram atividade da enzima similar ao longo do período avaliado e, superior para o biótipo suscetível aos 48HAA (Figura 20A). Para peroxidase, foi constatada diferença estatística significativa entre os biótipos em todos os tempos onde a máxima atividade da enzima no biótipo resistente ocorreu 48 HAA enquanto que, para o biótipo suscetível, a atividade da enzima peroxidase aumentou significativamente até 192HAA (Figura 20B). O aumento de EROs em plantas sob estresse tem sido relatado como uma via de sinalização para ativação dos sistemas de defesa. Aumento da SOD foi reportado em plantas de milho como um mecanismo de defesa celular limitando a formação de H_2O_2 e radicais livres para tolerância ao déficit hídrico (MALLIK et al., 2011).

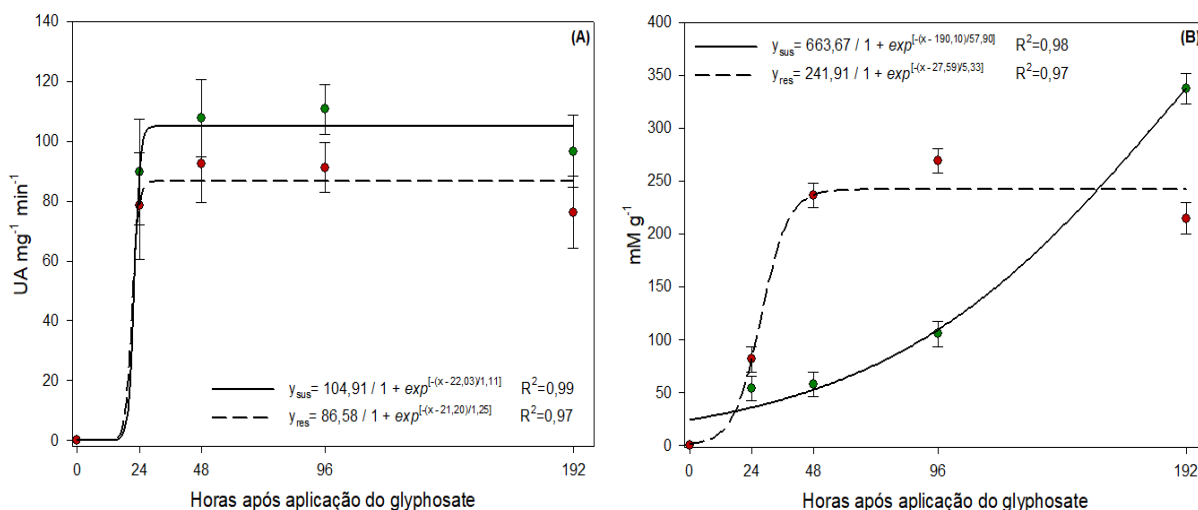


Figura 20- Atividade das enzimas antioxidantes SOD (A) e H₂O₂ (B) nos biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) em resposta ao herbicida glifosato na dose de 2160 g ea. ha⁻¹ avaliado em diferentes tempos após aplicação. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019. Os pontos representam os valores médios das repetições e, as barras, são os respectivos intervalos de confiança da média dos tratamentos no tempo ($p < 0,05$).

O aumento na atividade das enzimas antioxidantes SOD, APX e glutathione-S-transferase devido ao aumento do H₂O₂ foi demonstrado em plantas de arroz expostas ao glifosato em resposta ao estresse oxidativo (AHSAN et al., 2008). Todavia, plântulas de *A. thaliana* L. expostas ao glifosato apresentaram menor atividade da SOD quando expostas a 20µM de glifosato e aumento significativo na atividade da APX e catalase, demonstrando que outras enzimas do estresse oxidativo envolvidas no metabolismo podem compensar os efeitos negativos da H₂O₂ e proteger do dano celular (FREITAS-SILVA et al., 2017).

As peroxidases são enzimas envolvidas em vários processos biológicos onde atuam na clivagem do H₂O₂ devido a presença de um grupo heme ou aminoácido (cisteína) como cofator, conferindo proteção contra o dano oxidativo (MITTLER, 2017). Aumento significativo na atividade da peroxidase foi demonstrado em plantas de *Arachis hypogaea* L. (amendoim) submetidas a 720 g e.a. ha⁻¹ de glifosato como mecanismo de defesa em resposta ao acúmulo de H₂O₂ e peroxidação de lipídeos (RADWAN; FAYEZ, 2016).

Ao avaliar a atividade de TBARs, os resultados demonstraram diferença estatística significativa entre os biótipos com acúmulo de MDA sete vezes maior no biótipo suscetível (SVA02) comparado ao resistente (SVA04) aos 192 HAA (Figura 21). Em plantas, o acúmulo de MDA é um forte indicativo da ocorrência de peroxidação lipídica das células e tecidos em resposta ao estresse oxidativo

(GUNES et al., 2007). De maneira similar, o menor acúmulo de MDA foi reportado em biótipos de *A. palmeri* S. Watson resistentes ao glifosato após aplicação do herbicida, indicando que o aumento na atividade de enzimas antioxidantes podem ser contribuir na clivagem de EROs e proteção celular (MAROLI et al., 2015).

Em plantas, a peroxidação lipídica induzida pelo glifosato é um processo conhecido que pode causar danos a integridade celular. Além disso, o aumento das EROs causa efeitos sobre processos fotossintéticos com redução no conteúdo de clorofila, eficiência fotoquímica e metabolismo do carbono (GOMES et al., 2014). Resultados recentes demonstraram elevada produção de radicais livres e peroxidação lipídica em plantas de *A. palmeri* S. Watson suscetíveis ao glifosato devido a inibição do ciclo de Krebs e da rota das pentoses (MAROLI et al., 2015).

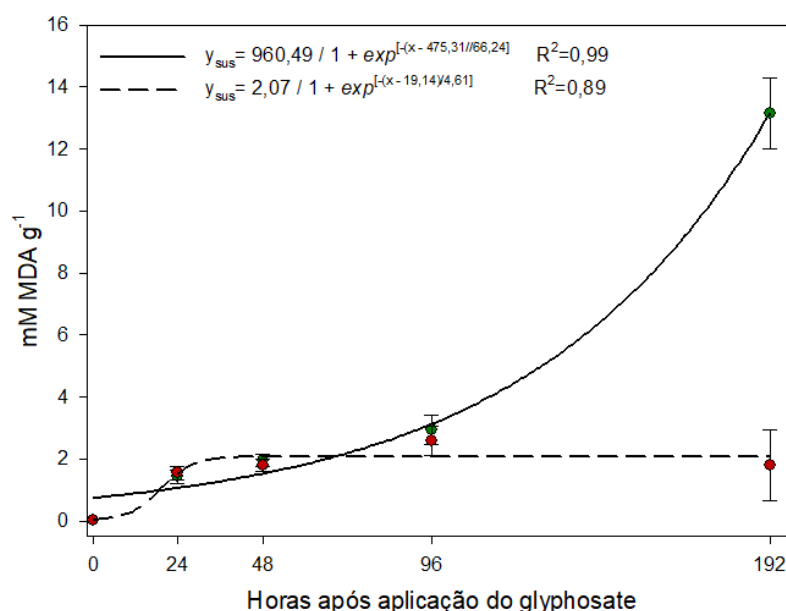


Figura 21- Atividade de TBARs nos biótipos de azevém suscetível (SVA02) e resistente (SVA04) em resposta ao herbicida glifosato na dose de 2160 g e.a. ha⁻¹ avaliado em diferentes tempos após aplicação. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019. Os pontos representam os valores médios das repetições e, as barras, são os respectivos intervalos de confiança da média dos tratamentos no tempo ($p < 0,05$).

O aumento da atividade antioxidante em plantas resistentes expostas a herbicidas pode acarretar em menor formação de EROS e limitado dano celular (DÈYLE et al., 2013). Além disso, outros marcadores não enzimáticos do estresse oxidativo como inositol, ascorbato e serina podem apresentar atividade aumentada em resposta ao glifosato (SERRA et al., 2013; FOYER; NOCTOR, 2011).

A abordagem molecular com transcriptoma e a análise complementar *in vivo* dos mecanismos de resistência ao glifosato em biótipos de *L. multiflorum* Lam. foram importantes para avaliação das alterações relacionadas ao local alvo e não local de ação. Para o biótipo resistente (SVA04), os resultados evidenciaram menor acúmulo de chiquimato, aumento parcial do metabolismo herbicida e na atividade das enzimas antioxidantes APX, H_2O_2 e TBARs comparado ao biótipo suscetível após aplicação do herbicida glifosato (Figura 22).

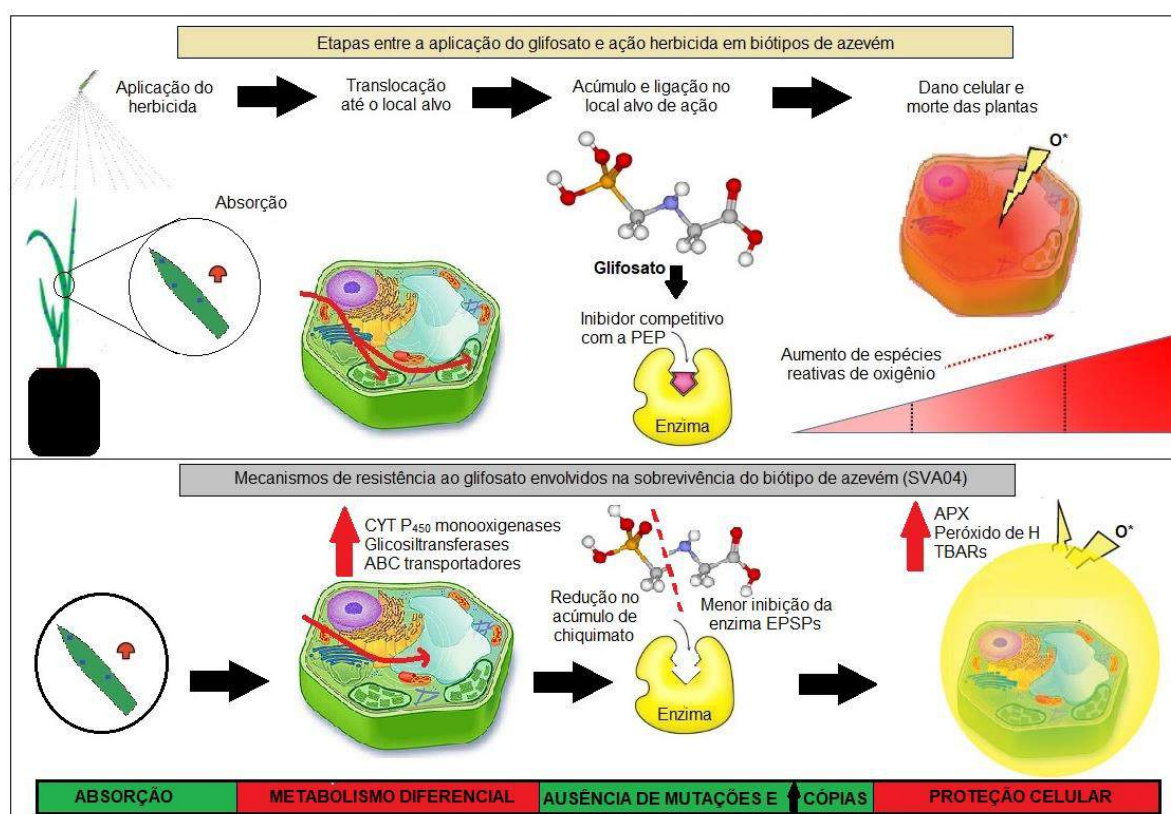


Figura 22- Esquema simplificado sobre os mecanismos de resistência envolvidos na sobrevivência do biótipo de azevém SVA04. FAEM/UFPEl, Capão do Leão/RS, 2019.

O entendimento dos aspectos relacionados ao metabolismo e a adoção de outras práticas de manejo para biótipos resistentes como a avaliação da viabilidade das sementes no banco do solo, utilização de culturas com potencial supressor, controle físico e/ou mecânico, herbicidas para inviabilização de sementes com herbicidas são ferramentas que devem ser compreendidas e, importantes para evitar a evolução da resistência e garantir viabilidade econômica e sustentável ao produtor.

3.4 Conclusões

O acúmulo de chiquimato do biótipo de azevém SVA04 foi menor comparado ao SVA02 com I_{50} de 1275 e 182 g e.a. ha^{-1} , respectivamente.

O biótipo resistente (SVA04) apresentou metabolização diferencial parcial ao herbicida glifosato através dos inibidores malathion e PBO do complexo enzimático da P_{450} monooxigenase com níveis de controle superiores e redução da MMSPA comparada a aplicação isolada do herbicida.

A sequência do gene EPSPs obtida do transcriptoma não evidenciou aumento no número de cópias do gene. Além disso, verificou-se ausência de alterações de aminoácidos para as posições Thr-102 e Pro-106 no biótipo resistente (SVA04).

Uma mutação na posição 367 do gene resultando na substituição do aminoácido Cisteína por Arginina (Cys₃₆₇-Arg) foi encontrada, sem apresentar envolvimento na resistência do biótipo resistente ao glifosato.

As enzimas antioxidantes APX, H_2O_2 e TBARs apresentaram atividade diferencial no biótipo resistente (SVA04) comparado ao biótipo suscetível (SVA02) após exposição de 2160 g ea. ha^{-1} de glifosato.

4. CAPÍTULO III – Práticas de manejo para supressão e redução do banco de sementes de *Lolium multiflorum* Lam. resistente ao herbicida glifosato.

4.1 Introdução

As plantas daninhas são consideradas agentes do estresse que competem com as culturas por recursos limitantes e essenciais ao desenvolvimento, causando danos econômicos e redução do potencial produtivo (AGOSTINETTO et al., 2008). No Brasil, o azevém (*L. multiflorum* Lam.) é a principal planta daninha de inverno encontrada em lavouras cultivadas com trigo e cevada, podendo ainda ser usada como forragem para alimentação animal ou como planta de cobertura para sistemas de semeadura direta (VARGAS et al., 2005).

Atualmente, o azevém apresenta ampla distribuição geográfica na Região Sul do Brasil, com mais de quatro milhões de hectares com problemas de resistência. A ocorrência crescente de biótipos de azevém resistentes ao glifosato em diversas lavouras após elevada pressão de seleção oriundos do uso repetido de herbicidas inibidores da enzima EPSPs, tem reduzido as opções de manejo e tornado o controle mais oneroso (VARGAS et al., 2016). Além disso, outros fatores têm contribuído para o aumento da área infestada como o elevado número de sementes produzidas por planta, deiscência precoce antes da colheita do trigo, fácil dispersão e dormência de sementes, que contribuem para a realimentação do banco de sementes do solo, garantindo sua sobrevivência nas áreas de cultivo e futuras infestações (NORRIS, 2007; FERNÁNDEZ-MORENO et al., 2017).

A busca por medidas alternativas de manejo visando retardar a evolução da resistência de plantas daninhas a herbicidas é um processo dinâmico, dependente do conjunto de fatores que podem ser manejados a fim de diminuir seu impacto

negativo a agricultura. Todavia, a alternância das práticas de manejo geralmente ocorre quando a presença de biótipos resistentes está em nível crítico (BURGOS; TRANEL; STREIBIG, 2013). Os herbicidas são considerados ferramentas importantes no manejo de plantas daninhas em função de sua eficácia e papel vital na diversificação e integração em estratégias de controle, especialmente para práticas que visem reduzir a entrada e realimentação dos bancos de sementes (WALSH; POWLES, 2007; NORSWORTHY et al., 2012).

Em sistemas agrícolas, a comunidade de plantas daninhas é dinâmica, com mudanças temporais quanto as condições do ambiente e que podem ser afetadas pelo conjunto de práticas de manejo do solo (ARMENGOT et al., 2017). Os métodos eficazes no manejo de plantas daninhas devem evitar a produção de sementes e promover o esgotamento do banco de sementes (CHAUHAN et al., 2006) através de ambientes desfavoráveis para a germinação e o estabelecimento de plantas daninhas (SHANER; BECKIE, 2014). As principais práticas agrônômicas alternativas visando aumentar a mortalidade das sementes, afetar a germinação e diminuir o desenvolvimento de plantas daninhas incluem rotação de culturas, manejo do solo, uso de culturas supressoras e inviabilização de sementes (SWANTON; BOOTH, 2004; HARKER, 2013). Além disso, a presença e capacidade de interferência das plantas daninhas em áreas de cultivo está relacionada com a dinâmica populacional dos bancos de sementes e ao grau de dormência, podendo interferir em maior grau dependendo do momento em que emergirem (GHERSA et al., 1997).

Para plantas daninhas, a dormência das sementes é uma estratégia evolutiva que causa atraso da germinação no tempo devido a características intrínsecas, impede o estabelecimento sob condições inadequadas e permite diferentes flutuações populacionais (GRAEBER et al., 2012; NÉE; XIANG; SOPPE, 2017). Além disso, a dormência é diretamente regulada pelo ambiente (temperatura, luz, umidade do solo) e fatores endógenos e exógenos da semente envolvidos na regulação do metabolismo e germinação (NÉE; XIANG; SOPPE, 2017). Já, o nível de dormência e a viabilidade das sementes no solo pode ser afetado por práticas de manejo como aração e gradagem, causando mudanças temporais de temperatura e no conteúdo de água no perfil do solo (YAMASHITA; GUIMARÃES, 2010).

Em nível hormonal, a germinação das sementes dormentes ocorre através da ação e interação de diversos fitohormônios, especialmente ácido abscísico (ABA) e ácido giberélico (GA_3) que atuam na sinalização e indução da germinação (MILLAR

et al., 2006). Respostas diferenciais quanto ao grau de dormência em diversas plantas daninhas podem ocorrer em função dos níveis de metabolismo entre ABA e GA₃ onde atuam na maturação de sementes, fatores de transcrição, regulação de genes específicos como DOG-1 (*Delay of germination-1*) e processos não enzimáticos envolvidos na germinação (GRAEBER et al., 2012). Níveis baixos de dormência tendem a favorecer a germinação e mortalidade de plântulas enquanto que níveis elevados causam atraso na germinação e reduzem o tempo para desenvolvimento de plântulas (DONOHUE et al., 2010).

Para plantas daninhas, a exposição das sementes a condições favoráveis de germinação geralmente coincide com a semeadura das culturas, onde a ocorrência de fluxos descontínuos de germinação dificulta o manejo químico, seguido de aumento dos escapes e interferência sobre a produtividade final. Nesse sentido, o uso de culturas com potencial supressor pode ser considerado uma ferramenta importante para redução do desenvolvimento e interferência das plantas daninhas, podendo favorecer a redução dos bancos de sementes do solo (LAWSON et al., 2015; BARAIBAR et al., 2018). A supressão das plantas ocorre quando há a dominância de um indivíduo sobre outro ao utilizar, concomitantemente, um recurso limitado do meio (AARSSSEN, 1983). Dessa forma, é importante a utilização de plantas de cobertura de solo que apresentem rápido crescimento inicial e mais competitivas (FLECK et al., 2003; BALBINOT JR; MORAES; BACKES, 2007), contribuindo para a redução do banco de sementes (DAVIS; CARDINA; FORCELLA, 2005).

A supressão de plantas daninhas por culturas de inverno pode ser ainda mais evidente quando se utiliza herbicidas alternativos, reduzindo significativamente a evolução da resistência (COLLAVO; STREK; BEFFA, 2013). No trigo, os problemas crescentes de resistência do azevém para herbicidas aplicados na pós-emergência da cultura implica em mudanças quanto as estratégias de manejo químico (BOUSALIS; GILL; PRESTON, 2014). Nesse sentido, os herbicidas pré-emergentes são opções viáveis para manejo de azevém resistente, garantindo a emergência do trigo em área limpa e maior potencial competitivo. Todavia, a eficácia e a seletividade destes herbicidas na cultura do trigo dependem do modo de ação de cada molécula e das condições do ambiente e do solo, devendo ser avaliados com critério devido as semelhanças ecofisiológicas do azevém com a cultura. Novas opções de herbicidas pré-emergentes para o controle de azevém resistente

permitem maior flexibilidade de manejo e auxiliam na redução dos bancos de sementes (WALSH et al., 2011; BOUTSALIS; GILL; PRESTON, 2014).

De maneira similar, outras práticas do manejo integrado como o método físico e mecânico aliado a rotação de culturas podem auxiliar na redução da interferência do azevém e contribuir significativamente na redução da realimentação dos bancos de semente (MIRSKY et al., 2010; HARKER; O'DONOVAN, 2013). Resultados reportaram que o acúmulo de sementes de espécies gramíneas na superfície do solo é maior na ausência de revolvimento do solo, evidenciando maior potencial em ocupar as áreas de cultivo comparado ao preparo convencional e maior dependência do controle químico (SCHERNER; MELANDER; KUDSK, 2016). Outra janela importante de manejo é a inviabilização das sementes de azevém resistente na pré-colheita do trigo possibilitando redução dos bancos de sementes devido a perda de qualidade fisiológica e aumento de sementes mortas (CAMPOS et al., 2012). A inibição de processos fisiológicos em função da aplicação de herbicidas pode afetar a formação das sementes devendo ser realizada em estágio adequado para que haja maior inviabilização das sementes (PIASECKI et al., 2019).

A avaliação das práticas de manejo para controle de azevém resistente ao glifosato são essenciais para fornecer informações sobre a dinâmica populacional e elencar estratégias para redução do banco de sementes do solo e evitar infestações futuras, permitindo a manutenção das áreas de cultivo e protegendo o potencial produtivo das culturas. O objetivo deste trabalho foi avaliar práticas de manejo para supressão, inviabilização, controle e redução dos bancos de sementes do solo de azevém resistente ao herbicida glifosato.

4.2 Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos a campo, em casa de vegetação e no laboratório de sementes pertencentes ao CEHERB/FAEM/UFPel. O solo da área experimental foi classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo pertencente a unidade de mapeamento Pelotas (EMBRAPA, 2013) e, a correção da fertilidade foi realizada previamente conforme as recomendações técnicas de cultivo para cada cultura (SBCS, 2016). A apresentação dos materiais e métodos específicos de cada experimento estão descritos abaixo.

4.2.1 Longevidade das sementes de *Lolium multiflorum* Lam. submetidas a diferentes profundidades de enterrio.

A longevidade das sementes de azevém foi avaliada em experimento conduzido a campo, no período de outubro de 2016 a novembro de 2018, utilizando o delineamento experimental blocos casualizados com quatro repetições. Antes do enterrio, as sementes dormentes da planta mãe foram selecionadas manualmente em diafanoscópio e, a viabilidade, foi avaliada em solução de tetrazólio a 1% (BRASIL, 2009). Ao todo, 50 sementes viáveis foram colocadas dentro de saquinhos de nylon permeável medindo 10x10cm, preenchidos com 50 g de solo e enterradas em diferentes profundidades.

A viabilidade das sementes de azevém foi avaliada em cinco profundidades de enterrio (0,5; 2,5; 5,0; 10 e 20cm) em trincheiras previamente abertas e, o resgate das sementes, foi realizado em oito tempos (zero, 30, 60, 90, 180, 360, 540 e 720 dias após o enterrio). Além disso, um teste prévio de germinação com sementes de azevém não dormentes foi conduzido para avaliar a capacidade de emergência, usando as profundidades de enterrio avaliadas no estudo de viabilidade. Este estudo foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, usando caixas tetra park (papelão e filme polietileno) contendo solo e 50 sementes viáveis cada, com avaliação da percentagem de germinação realizada aos 14 dias após enterrio (DAE).

As amostras de campo recolhidas em cada tempo foram submetidas a lavagem em água corrente utilizando conjuntos de peneiras de 16, 32 e 60 mesh. Após a lavagem, as amostras permaneceram sob papel filtro por 24 horas e, as sementes remanescentes, foram coletadas manualmente e separadas para o teste de germinação. O estudo foi realizado no laboratório utilizando caixas plásticas transparentes (11,5x11,5x3,5cm), nas quais foram distribuídas em duas folhas de papel, previamente umedecidas com água destilada em quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do papel mata-borrão, permanecendo em câmara de germinação por 14 dias em temperatura alternada de 20/30°C noite/dia e fotoperíodo de 8h dia⁻¹, seguindo as regras para análise de sementes (BRASIL, 2009).

As variáveis avaliadas foram percentagem de sementes resgatadas, germinação, plântulas anormais, sementes mortas/predadas e deterioradas além da percentagem de sementes dormentes viáveis e não viáveis. A avaliação da

germinação e das demais variáveis foi realizada 14 dias após início do teste de germinação, sendo considerada a semente germinada aquela que apresentou extrusão visível da radícula e/ou coleóptilo (BRASIL, 2009). As sementes que não germinaram foram submetidas ao teste de tetrazólio a 1% onde foi realizado um corte longitudinal do embrião seguido de embebição por seis horas à temperatura de 30°C, conforme as regras para análise de sementes (BRASIL, 2009).

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade e, posteriormente, a análise de variância ($p \leq 0,05$). Caso constatada significância estatística, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$) para o fator profundidade de enterrio e, foi realizada análise de regressão para o fator tempo de enterrio das sementes.

Para as variáveis sementes resgatadas, sementes dormentes viáveis e sementes mortas, predadas e/ou deterioradas, os dados se ajustaram à equação de regressão do tipo exponencial sigmoidal com três parâmetros:

$$y = a / 1 + \exp^{-(x-x_0)/b}$$

onde: y = variável resposta de interesse; x = dias após enterrio; \exp = função exponencial; x_0 = é o número de dias que proporciona 50% da resposta variável e b = declividade da curva.

Para as variáveis percentagem de germinação, plântulas anormais e sementes não-viáveis, os dados se ajustaram a equação de regressão com distribuição do tipo Gaussian de três parâmetros:

$$y = a * \exp^{-0,5*((x-x_0)/b)^2}$$

onde: y = variável resposta de interesse; \exp = função exponencial; x = dias após enterrio; a = representa a diferença entre os pontos máximo e mínimo da variável; b = declividade da curva; e, x_0 = ponto máximo da variável.

4.2.2 Germinação e quantificação temporal dos hormônios da dormência em sementes de *Lolium multiflorum* Lam.

O estudo foi conduzido em laboratório de sementes do CEHERB/UFPel em delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições. O teste de germinação das sementes dormentes foi avaliado aos zero, 15, 30, 60 e 120 dias após colheita da planta-mãe (temperatura ambiente) e a quantificação dos

hormônios da dormência primária do azevém diploide (ácido abscísico, ácido giberélico e ácido 3-indol acético) foi realizado nos tempos do teste de germinação.

Ao todo, 50 sementes foram alocadas em caixas plásticas transparentes (11,5x11,5x3,5cm) contendo duas folhas de papel mata-borrão, previamente umedecidas com água destilada em quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do papel onde permaneceram em câmara de germinação por 14 dias com temperatura alternada de 20/30°C noite/dia e fotoperíodo de 8h dia⁻¹, seguindo as regras para análise de sementes (BRASIL, 2009).

As variáveis avaliadas foram percentagem de germinação, plântulas anormais, sementes mortas, percentagem de sementes dormentes viáveis e não viáveis. A avaliação da germinação e demais variáveis foi realizada 14 dias após início do teste de germinação, sendo considerada a semente germinada aquela que apresentou extrusão visível da radícula e/ou coleótilo (BRASIL, 2009). As sementes que não germinaram foram submetidas ao teste de tetrazólio a 1% onde foi realizado um corte longitudinal do embrião seguido de embebição por seis horas à temperatura de 30°C, conforme as regras para análise de sementes (BRASIL, 2009).

Para quantificação dos fitohormônios, as sementes de azevém foram colhidas de plantas-mãe na maturidade fisiológica e mantidas a temperatura ambiente, sendo armazenadas em ultrafreezer a -80°C nos diferentes tempos avaliados. O protocolo para extração dos hormônios ácido abscísico (ABA), ácido giberélico (GA₃) e ácido 3-indol acético seguiu a metodologia proposta por Pan et al. (2008) com algumas modificações. As sementes cheias foram selecionadas em um diafanoscópio, liofilizadas e moídas em moinho de bolas. Para cada tratamento, três repetições com ±100mg de sementes foram pesadas em balança analítica e colocadas em eppendorf contendo 650µL de solução composta de 1-propanol, água ultrapura e ácido clorídrico concentrado (HCl) na proporção de 2:1:0,001, respectivamente. As amostras foram agitadas a 4°C por 30 minutos, seguidas da adição de 1300µL de diclorometano, sendo submetidas a nova agitação a 4°C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a frio por 10 min a 10000 rpm e, a fração líquida foi separada e concentrada em TurboVap utilizando nitrogênio líquido e pressão constante. A solubilização das amostras foi realizada com adição de 200µL de água ultrapura e ácido cianídrico na proporção 1:1 e, a solução final, foi filtrada em uma membrana de nylon de 0,22µm (AllCrom, St. Louis, Mo, EUA) e colocada em frascos para análise em cromatografia.

A quantificação dos fitohormônios da semente foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu, Japão) acoplado em espectrômetro de massa de quadrupolo-tempo-de-voo (QTOF-MS, Bremen, Alemanha). A separação foi realizada em HPLC equipado com desgaseificador em linha, bomba binária, detector de arranjo de diodos e amostrador automático, usando uma coluna de fase reversa (Hyperclone ODS C18 - 125mm de comprimento × 4,0mm, tamanho de partícula interno de 5µm). A fase móvel foi avaliada através de um gradiente linear utilizando 0,1% de ácido fórmico em água (eluição A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (eluição B). O gradiente utilizado para a composição inicial da fase móvel foi de 20% (eluição B) e permaneceu constante por 2min, aumentando para 30% nos próximos 4 minutos e, para 38, 50 e 70% mantidas por 2 minutos cada. Após isso, a fase móvel foi ajustada às condições iniciais (20%) por 3 minutos para estabilização e, o fluxo foi mantido constante a 0,2 mL min⁻¹, com temperatura da coluna ajustada a 40°C e utilizando um volume de injeção de 10µL (PEREZ-ORTEGA et al., 2012).

O espectrômetro de massa foi operado no modo ESI negativo onde o espectro foi obtido ao longo de uma faixa de massa variando entre 50 a 1200m/z. Os parâmetros de aquisição foram 4kV de tensão capilar, 2bar de pressão de gás de nebulização (N₂) com gás de secagem a 8L min⁻¹, 180°C de temperatura e colisão RF de 150Vpp; transferência de 70mS e armazenamento pré-pulso de 5mS. O equipamento foi calibrado com 10mM de formiato de sódio para cobrir toda a banda de aquisição (50 a 1200m/z). Além disso, experimentos automáticos de MS/MS foram realizados ajustando os valores de energia de colisão como segue: 100m/z, 15eV; 500m/z, 35eV e 1000m/z e 50eV usando gás nitrogênio para colisão. O processamento da curva de calibração e os dados de quantificação foram realizados usando a análise do software Quany. Os dados obtidos foram analisados quanto a sua homocedasticidade, e posteriormente submetidos à análise de variância (p≤0,05). Em caso de significância estatística, a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey (p≤0,05) com os valores expressos em µg g⁻¹.

4.2.3 Germinação de sementes dormentes de *Lolium multiflorum* Lam. com nitratos e reguladores endógenos.

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de sementes pertencentes

ao Departamento de Fitossanidade da FAEM/UFPel em delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições. As sementes de azevém foram colhidas de plantas-mães e, submetidas ao teste de tetrazólio para avaliar a viabilidade, seguindo as regras para análise de sementes (BRASIL, 2009).

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial (5x5+1) onde o fator A foi constituído dos nitratos e reguladores endógenos (nitrato de potássio, nitrato de cálcio, nitrato de amônia, óxido nítrico e ácido giberélico) e, o fator B, foi composto por cinco concentrações (zero, 0,1, 1, 10 e 100ppm) comparadas com a testemunha padrão que foi estratificada a frio a temperatura de 5°C por sete dias para superação da dormência. Ao todo, 50 sementes foram alocadas em caixas plásticas transparentes (11,5x11,5x3,5cm) contendo duas folhas de papel mata-borrão, previamente umedecidas com água destilada em quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do papel onde permaneceram em câmara de germinação por 14 dias com temperatura alternada de 20/30°C noite/dia e fotoperíodo de 8h dia⁻¹, seguindo as regras para análise de sementes (BRASIL, 2009).

As variáveis avaliadas foram percentagem de germinação, plântulas anormais, sementes mortas, percentagem de sementes dormentes viáveis e não viáveis mensuradas aos 14 dias após início do teste de germinação, sendo considerada germinada a semente que apresentou extrusão visível da radícula e/ou coleóptilo. As sementes que não germinaram foram cortadas longitudinalmente ao embrião e submetidas a embebição por seis horas à temperatura de 30°C em sal de tetrazólio a 1%, seguido de análise visual em lupa (BRASIL, 2009).

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade (teste de Shapiro Wilk) e, posteriormente, submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Em caso de significância estatística, foi realizada análise de regressão para o fator concentração dos nitratos e reguladores endógenos.

4.2.4 Potencial supressor das culturas de inverno sobre o azevém em áreas agrícolas do Sul do Brasil.

O experimento de campo foi conduzido durante as safras de 2016-2018 em delineamento experimental blocos ao acaso com quatro repetições. As coberturas de inverno utilizadas foram trigo, canola, cevada, ervilhaca, centeio, nabo, aveia-preta e pousio com e sem controle, com sucessão durante o verão pela cultura da

soja Roundup Ready®. As culturas de inverno foram alocadas em faixas com parcelas medindo 7,65m² (5 x 1,53m) cada. O estabelecimento e a condução das culturas foram realizados conforme as indicações técnicas de cultivo específicas (SBCS, 2016). Para implementação das culturas de inverno foi realizado a aplicação do herbicida paraquat+diuron na dose de 200+100 g i.a. ha⁻¹ e, o manejo das plantas daninhas na cultura da soja, foi realizado com a aplicação do herbicida glifosato na dose de 720 g e.a. ha⁻¹. A aplicação foi realizada com pulverizador costal, com pontas de pulverização do tipo leque 110.015, espaçadas a 50 cm, regulado para aspergir 120 L ha⁻¹.

As variáveis avaliadas foram população do azevém e das culturas (plantas m⁻²) ao final de cada ciclo das plantas, estatura das plantas de azevém e das culturas no início do florescimento, produção de massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) do azevém e das plantas de cobertura e banco de sementes ao final do ciclo.

As contagens da população de azevém foram realizadas em dois pontos da parcela utilizando quadro amostral de 0,25m² enquanto que, a população das coberturas, foi avaliado em 0,5m linear, sendo transformadas para plantas m⁻². A estatura do azevém e das culturas foi realizada com regra milimétrica a partir de 10 plantas da parcela, enquanto que a MMSPA do azevém e das culturas de cobertura, foi obtida através da coleta das plantas em área de 0,25m² com quantificação realizada após secagem em estufa a 60°C por 72 horas e, os dados transformados para toneladas ha⁻¹. O banco de sementes foi avaliado previamente ao início do experimento em três profundidades (0-5; 5-10 e 10-20cm) e ao final do ciclo das culturas de inverno de cada ano. A coleta foi realizada com trado calador medindo 2,5cm de diâmetro e 5cm de altura onde o solo foi coletado em um ponto de cada parcela composto por três sub-amostras por ponto.

As amostras foram colocadas em recipientes plásticos devidamente identificados onde permaneceram em casa de vegetação para contagem de plântulas emergidas conforme o método descrito por Brown (BROWN, 1992), com intervalos de contagens a cada 15 dias durante o período de 120 dias. Após este período, as amostras de solo foram lavadas com água usando um conjunto de peneiras de nylon de 30, 45 e 120 mesh para separar as sementes e detectar sementes viáveis que poderiam estar dormentes. A viabilidade foi avaliada em sal de

tetrazólio a 1% após corte longitudinal do embrião e embebição por seis horas à temperatura de 30°C (BRASIL, 2009).

O banco total de sementes do solo foi obtido através da soma das plântulas emergidas em casa de vegetação e das sementes viáveis que não germinaram após avaliação (PRICE et al., 2010).

$$\Sigma \text{ banco total de sementes do solo} = \Sigma \text{ germinação em casa de vegetação} + \Sigma \text{ sementes viáveis}$$

Os dados obtidos foram analisados quanto a sua homocedasticidade, e posteriormente, submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Ocorrendo significância estatística, as médias dos tratamentos para cada variável foram comparadas pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

4.2.5 Herbicidas pré-emergentes na cultura do trigo para manejo de *Lolium multiflorum* Lam. resistente ao glifosato.

Os experimentos a campo foram realizados durante os anos agrícolas 2017 e 2018 em delineamento experimental blocos ao acaso com quatro repetições. As parcelas contendo os tratamentos herbicidas pré-emergentes foram alocadas em área medindo 6,1m² (4,0 x 1,53 m).

A semeadura do trigo ocorreu em meados de maio, utilizando-se 110Kg do cultivar Tbio Sinuelo, em linhas espaçadas a 0,17m, permitindo o estabelecimento de 300 plantas m⁻². A adubação de base foi realizada conforme a análise de solo utilizando-se 330 Kg ha⁻¹ de adubo NPK, na formulação 05-20-20 seguido de adubação complementar de cobertura utilizando-se 100 Kg de N ha⁻¹ de ureia. O estabelecimento e demais tratamentos culturais foram realizados conforme as indicações técnicas de cultivo.

A aplicação dos herbicidas foi realizada com pulverizador costal pressurizado a CO₂, com pontas de pulverização do tipo leque 110.015, espaçadas a 50 cm, a pressão constante e regulado para aspergir 120 L ha⁻¹. Os tratamentos utilizados preconizaram estratégias de manejo químico na pré-emergência do trigo considerando a existência de populações de azevém com resistência múltipla, conforme consta na tabela 10.

Tabela 10- Herbicidas pré-emergentes avaliados para controle de azevém na cultura do trigo. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019.

Ingrediente ativo	Produto comercial	Dose PC mL ou g ha⁻¹	Dose (i.a. ha⁻¹)
Pendimetalina ¹	Herbadox	2500	1000
Trifluralina ¹	Trifuralin	2500	1500
Isoxaflutole ²	Provence	100	75
Clomazone ³	Gamit	1700	612
Alachlor ⁴	Alachlor Nortox	5000	2400
Piroxasulfone ⁴	Yamato	200	100
S-metolachlor ⁴	Dual Gold	1500	1440
Sulfentrazone ⁵	Boral	1000	500
Oxadiazon ⁵	Rosntar	2500	625
Oxifluorfen ⁵	Goal	2500	600
Atrazina ⁶	Atrazina Nortox	4000	2000
Diuron ⁶	Diuron Nortox	2500	1250
Metribuzin ⁶	Sencor	300	144
Limpa	---	----	---
Suja	---	---	---

¹Herbicida inibidor da formação de microtúbulos; ²Inibidor da 4-hidroxifenil piruvato dioxigenase (HPPD); ³Inibidor da 1-deoxi-xilulose 5-fosfatase (DOXP) sintase; ⁴Inibidor da síntese de ácidos graxos de cadeia longa; ⁵Inibidor da protoporfirinogênio IX oxidase (PPO); ⁶Inibidor do Fotossistema II.

As variáveis avaliadas foram controle de azevém e fitotoxicidade a cultura aos sete, 14, 28 e 56 dias após a emergência, população de azevém e da cultura aos 56 DAE e produtividade do trigo (kg ha⁻¹). O controle do azevém e a fitotoxicidade na cultura foram realizados utilizando a escala percentual onde a nota zero corresponde à ausência de dano e a nota cem corresponde à morte completa (FRANS; CROWLEY, 1986).

A contagem da população de azevém foi realizada em dois pontos de cada parcela utilizando um quadro amostral de 0,5 x 0,5m e, a população de trigo, foi avaliada através da contagem das plantas presentes em um metro linear, onde os valores foram transformados para plantas m⁻². A produtividade final foi obtida após colheita de 3,6m² da parcela que foi submetida a trilha, limpeza e pesagem em balança analítica, descontando-se a umidade para 13%.

Os dados obtidos foram analisados quanto a sua homocedasticidade, e posteriormente submetidos à análise de variância (p≤0,05). Ocorrendo significância estatística, as médias dos tratamentos para cada variável foram comparadas pelo teste Scott-Knot (p≤0,05).

4.2.6 Manejo do banco de sementes de azevém através de métodos físicos e mecânicos na pré-semeadura das culturas de verão.

O experimento foi realizado em delineamento experimental blocos ao acaso com quatro repetições durante as safras de 2017/18 e 2018/19. Os tratamentos foram arranjados em parcelas subdivididas onde a parcela principal foi contida pelos manejos (aiveca+gradagem, gradagem, roçada+feno e pousio), a subparcela foram as culturas (soja e milho Roundup Ready®) e, as subsubparcelas foram os anos avaliados. Durante o período de inverno, a área foi mantida com azevém que foi estabelecido em maio de 2016 e conduzido de acordo com as técnicas de cultivo para culturas forrageiras.

Nas parcelas experimentais foi efetuada o cultivo do milho e da soja Roundup Ready® nas suas respectivas épocas de semeadura (meados de setembro para o milho e final de outubro para a soja), em parcelas medindo 10m² (5 x 2m) cada. A semeadura do milho (cinco plantas m⁻¹) e da soja (36 plantas m²) foi realizada em linhas espaçadas 45cm entre si juntamente com uma adubação de base de 300 Kg ha⁻¹ de adubo NPK, na formulação 05-20-20. O estabelecimento e demais tratamentos culturais foram realizados conforme as indicações técnicas de cultivo para o Estado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

Os herbicidas utilizados na pós-emergência do milho Roundup Ready® foram glifosato na dose de 960 g e.a. ha⁻¹ combinado com o herbicida nicosulfurom na dose de 60 g i.a. ha⁻¹ e, na soja Roundup Ready®, foi utilizado o herbicida glifosato na dose de 1080 g e.a. ha⁻¹ combinado com o herbicida fluazifope-p-butílico na dose de 250 g i.a. ha⁻¹ (AGROFIT, 2018). A aplicação dos herbicidas foi realizada com pulverizador costal pressurizado a CO₂, com ponta de pulverização do tipo leque 110.015, espaçadas a 50 cm e pressão constante, regulado para aspergir 120 L ha⁻¹ de calda.

As variáveis avaliadas foram levantamentos da população de azevém, massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e banco de sementes do azevém em três profundidades do solo (0-5; 5-10 e 10-20cm). A contagem da população do azevém foi realizada ao final do ciclo do milho e da soja em dois pontos da parcela, utilizando um quadro amostral de 0,25m², sendo transformado para plantas m⁻². A MMSPA do azevém foi obtida através da coleta das plantas em área de 0,25m² de cada parcela,

onde o material coletado foi devidamente identificado e submetido a secagem em estufa a 60°C por 72 horas e, os valores transformados para toneladas ha⁻¹.

O banco de sementes foi avaliado previamente ao início do experimento em três profundidades (0-5; 5-10 e 10-20cm) e ao final do ciclo do azevém em cada ano. A coleta foi realizada com trado calador medindo 2,5cm de diâmetro e 5cm de altura, tomando-se um ponto por parcela composto por três sub-amostras cada. As amostras foram colocadas em recipientes plásticos devidamente identificados onde permaneceram em casa de vegetação para contagem de plântulas emergidas conforme o método descrito por Brown (BROWN, 1992), com intervalos de contagens a cada 15 dias durante o período de 120 dias. Após este período, as amostras de solo foram lavadas com água usando um conjunto de peneiras de nylon de 30, 45 e 120 mesh para separar as sementes e detectar sementes viáveis que poderiam estar dormentes. A viabilidade das sementes foi avaliada através de corte longitudinal do embrião seguido de embebição por seis horas à temperatura de 30°C em sal de tetrazólio a 1% (BRASIL, 2009).

O banco total de sementes do solo foi obtido através da soma das plântulas emergidas em casa de vegetação e das sementes viáveis que não germinaram após avaliação (PRICE et al., 2010).

$$\Sigma \text{ banco total de sementes do solo} = \Sigma \text{ germinação em casa de vegetação} + \Sigma \text{ sementes viáveis}$$

Os dados obtidos foram analisados quanto a sua homocedasticidade, e posteriormente submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Ocorrendo significância estatística, as médias dos tratamentos para cada variável foram comparadas pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$) e, o efeito do ano em cada cultura comparada pelo teste t ($p \leq 0,05$).

4.2.7 Inviabilização de sementes de *Lolium multiflorum* Lam. com herbicidas em diferentes estádios no período reprodutivo.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x3 com quatro repetições. As unidades experimentais foram comportas de vasos com capacidade volumétrica de 1L preenchidos com solo+substrato GerminaPlant® na proporção 2:1. O solo foi classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo onde a análise do solo

evidenciou pH em água= 5,6; CTC_{pH7}=7,2 cmol_c dm⁻³; matéria orgânica= 1,5%; argila= 16% ; textura= 4 ; Ca= 4,1 cmol_c dm⁻³; Mg= 1,1 cmol_c dm⁻³; Al= 1,8 cmol_c dm⁻³; P= 6,5 mg dm⁻³ e K= 0,15 cmol_c dm⁻³. A correção da fertilidade foi realizada previamente a mistura com o substrato conforme as recomendações para as culturas forrageiras (SBCS, 2016).

Os tratamentos herbicidas foram paraquate na dose de 400 g i.a. ha⁻¹, glufosinato de amônio na dose de 400 g i.a. ha⁻¹, iodosulfurom-metilico na dose de 5 g i.a. ha⁻¹, cletodim na dose de 120 g i.a. ha⁻¹ que foram comparados com a testemunha sem aplicação. Os herbicidas foram aplicados em três diferentes estádios reprodutivos do azevém (pré-espigamento, antese e enchimento dos grãos), conforme escala fenológica adaptada para cereais de inverno (BLEIHOLDER et al., 1997).

A aplicação dos herbicidas foi realizada com pulverizador costal pressurizado a CO₂, com ponta de pulverização do tipo leque 110.015, espaçadas a 50 cm, regulado para aspergir 120 L ha⁻¹ de calda.

As variáveis avaliadas foram controle visual do azevém e número de sementes cheias produzidas por planta. As avaliações de controle visual foram realizadas aos sete, 14 e 28 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT), utilizando a escala percentual de fitotoxicidade/controle onde a nota zero corresponde à ausência de dano e a nota cem corresponde à morte completa das plantas (FRANS; CROWLEY, 1986). O número de sementes cheias produzidas por planta foi obtido através da contagem visual em diafanoscópio de luz, onde foi padronizado a utilização de sete afilhos planta⁻¹ para fins de comparação.

As sementes produzidas após maturação plena foram armazenadas em geladeira por quatro meses e, submetidas ao teste de germinação para avaliação da percentagem de germinação, plântulas anormais, sementes mortas, percentagem de sementes dormentes viáveis e não viáveis. Ao todo, 50 sementes foram alocadas em caixas plásticas transparentes (11,5x11,5x3,5cm) contendo duas folhas de papel mata-borrão, previamente umedecidas com água destilada em quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do papel onde permaneceram em câmara de germinação por 14 dias com temperatura alternada de 20/30°C noite/dia e fotoperíodo de 8h dia⁻¹, seguindo as regras para análise de sementes (BRASIL, 2009). A primeira contagem de germinação foi avaliada cinco dias após início do teste e, as demais variáveis, foram mensuradas aos 14 dias após início do teste de

germinação, sendo considerada a semente germinada aquela que apresentou extrusão visível da radícula e/ou coleóptilo (BRASIL, 2009). As sementes que não germinaram foram submetidas a análise em sal de tetrazólio a 1% após corte longitudinal do embrião onde foram submetidas a embebição por seis horas à temperatura de 30°C, seguido de análise visual em lupa (BRASIL, 2009).

Os dados obtidos foram analisados quanto a sua homocedasticidade e, posteriormente, submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Ocorrendo significância estatística, as médias dos tratamentos herbicidas nos diferentes estádios foram comparados pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

4.3 Resultados e discussão

A apresentação dos resultados e discussão de cada experimento estão descritos abaixo, seguindo a sequência apresentada nos materiais e métodos.

4.3.1 Longevidade das sementes de *Lolium multiflorum* Lam. submetidas a diferentes profundidades de enterrio ao longo do tempo.

A análise de variância evidenciou efeito significativo sobre a germinação das sementes de azevém não dormentes aos 14 dias após enterrio (DAE), com valores superiores a 78% para enterrio até 5cm, diferindo estatisticamente apenas da germinação obtida nas profundidades enterrio realizadas a 10 e 20cm (Figura 23).

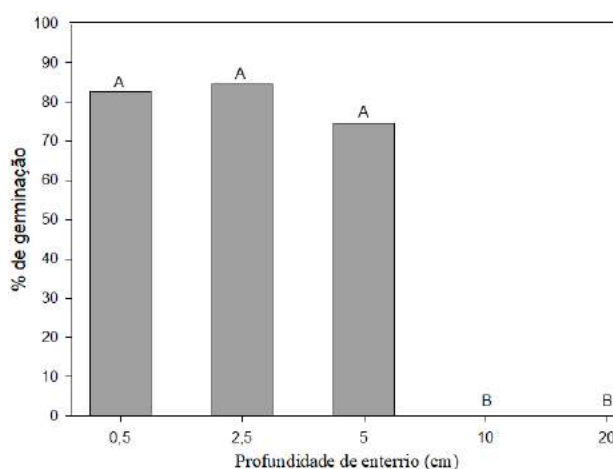


Figura 11- Percentagem de germinação de sementes de azevém viáveis não dormentes avaliado em diferentes profundidades de enterrio. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2019. Mesma letra maiúscula, não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Resultados similares foram encontrados para sementes de trigo onde a germinação aos 14 dias após enterrio foi acima de 80% para profundidades de até 5cm (MARTENS et al., 2017).

A análise variância evidenciou efeito significativo entre o fator tempo e profundidade de enterrio para todas as variáveis mensuradas ao avaliar a longevidade das sementes dormentes no banco do solo (Figura 24, 25 e 26). Os resultados evidenciaram diminuição significativa na porcentagem de sementes resgatadas para todas as profundidades testadas nas avaliações realizadas até 360 dias após enterrio onde mais de 85 e 65% das sementes foram perdidas nas profundidades de 0,5 e 20cm, respectivamente (Figura 24A).

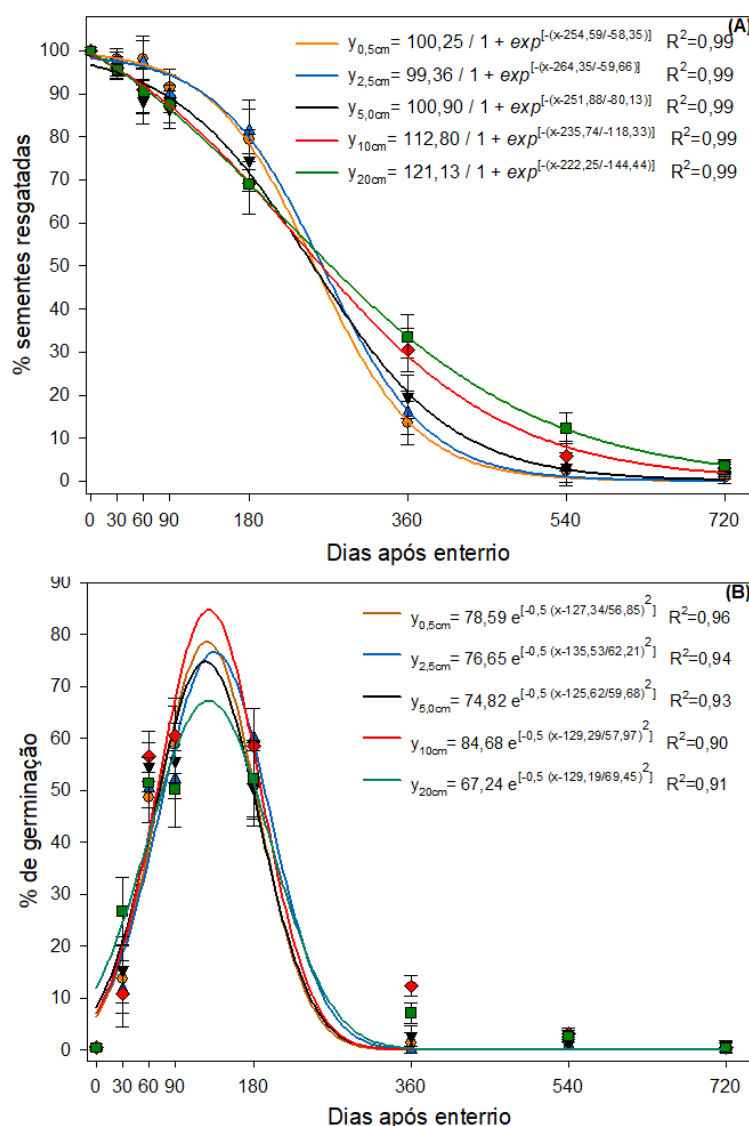


Figura 12- Percentagem de sementes resgatadas (A) e de germinação (B) avaliado em diferentes tempos e profundidades de enterrio. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019. Os pontos representam a média das repetições e, as barras, corresponde a diferença mínima significativa em cada tempo avaliado ($p < 0,05$).

Com base nos valores médios obtidos, foi constatado que o enterrio das sementes de azevém no solo até 2,5cm tende a favorecer as perdas comparado o enterrio em profundidades maiores, visto que aproximadamente 20% das sementes foram resgatadas na profundidade de 20cm aos 540 dias após enterrio (Figura 24A). Alterações significativas na dinâmica e na quantidade de sementes presentes no banco do solo podem ocorrer ao longo do tempo devido as perdas por germinação, migração e degradação/predação de microrganismos e invertebrados (FENNER; THOMPSON, 2005; CHEE-SANFORD et al., 2006). Além disso, as sementes alocadas na camada superficial do solo estão constantemente expostas a alterações de temperatura e umidade que pode favorecer a germinação das sementes e a atividade microbiana (MAIN et al., 2006).

Para a variável germinação, os valores máximos foram obtidos entre 90 e 180 dias após enterrio (DAE) onde mais de 50% das sementes germinaram independente da profundidade avaliada (Figura 24B). Além disso, os resultados evidenciaram aumento significativo na percentagem de germinação em todas as profundidades entre as avaliações realizadas aos 30 e 90 DAE devido redução da dormência das sementes de azevém, especialmente para profundidades maiores onde a superação da dormência ocorreu em menor tempo (Figura 24B). Todavia, redução significativa da germinação ocorreu entre 180 e 360 DAE onde aproximadamente 15% das sementes germinaram nas profundidades de 10 e 20cm e, menos de 5% para sementes na camada do solo superior a 5cm (Figura 24B). Para plantas daninhas, a dormência é considerada uma estratégia evolutiva importante permitindo fluxos descontínuos de germinação ao longo do tempo e/ou evita a germinação em períodos onde as condições ambientais são desfavoráveis para o desenvolvimento (GARDARIN; COLBACH, 2014). Alterações de temperatura e umidade nas camadas mais superficiais do solo favorecem a rápida superação dormência primária e aumentam a mortalidade, possibilitando menor longevidade do banco de sementes do solo (DAVIS et al., 2008; DONOHUE et al. 2010). Além disso, redução na germinação do azevém ocorre com o aumento da profundidade de enterrio, favorecendo a viabilidade no banco de sementes do solo no tempo (CHAUHAN et al., 2006).

Os resultados para plântulas anormais evidenciaram que os valores máximos foram encontrados para as sementes presentes na profundidade de 2,5cm com 9 e 8% aos 60 e 90 DAE, respectivamente (Figura 25A). A ocorrência de plântulas

anormais é um indicativo da perda de vigor que reduz a capacidade de desenvolvimento da planta e ocupação do banco de sementes do solo mesmo sob ambientes altamente favoráveis de temperatura, umidade e luminosidade (BARTH NETO et al., 2014).

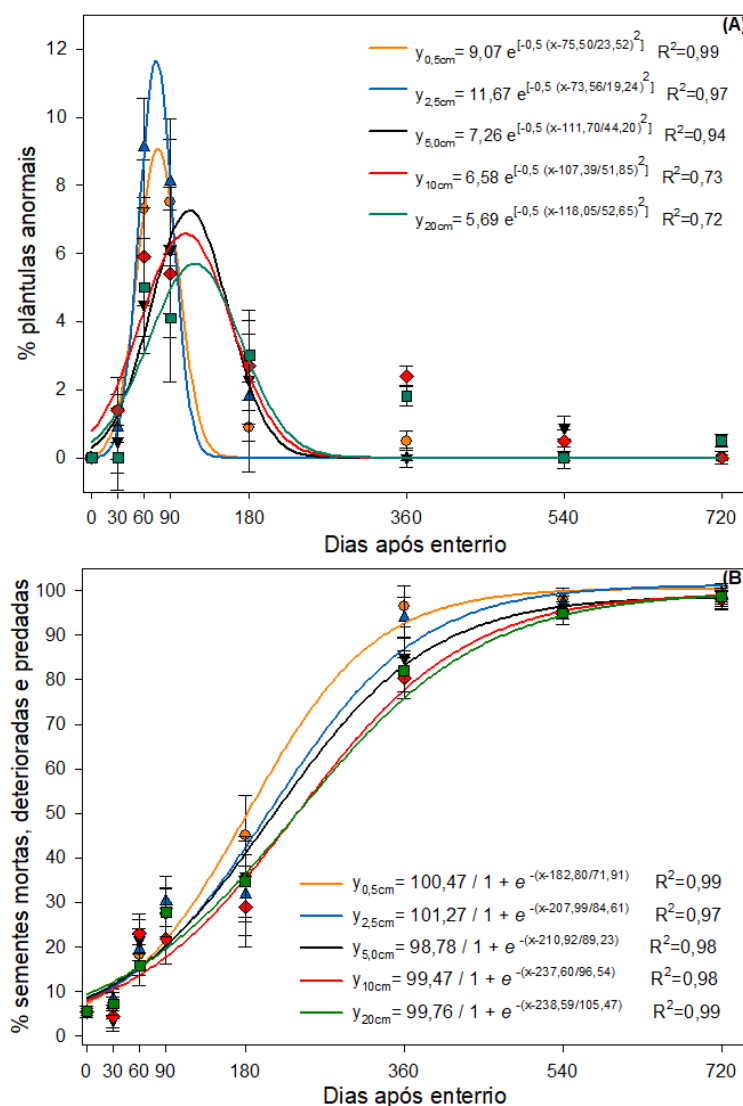


Figura 13- Percentagem de plântulas anormais (A) e sementes mortas/deterioradas e predadas (B) avaliado em diferentes tempos e profundidades de enterrio. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019. Os pontos representam a média das repetições e, as barras, corresponde a diferença mínima significativa em cada tempo avaliado ($p < 0,05$).

O aumento na percentagem de plântulas anormais na camada superficial pode estar relacionado a maior atividade microbiana e alterações de temperatura e umidade do solo comparado ao enterrio das sementes a 10 e 20cm onde o ambiente tende a ser mais homogêneo (NÉE; XIANG; SOPPE, 2017). De maneira similar, a

percentagem de sementes mortas, deterioradas e/ou predadas foi menor com o aumento da profundidade de enterrio (Figura 25B).

Os resultados evidenciaram que a mortalidade foi 15% menor aos 360 DAE para as sementes alocadas a 10 e 20cm comparado ao enterrio até 2,5cm. Além disso, mais de 94% das sementes foram perdidas até 540 DAE, independente da profundidade de enterrio, evidenciando que a viabilidade do azevém no banco de sementes do solo é curta (Figura 25B). Baixa persistência no banco de sementes do solo foi constatado para *L. rigidum* Gaudin. onde 100% das sementes perderam a viabilidade após 16 meses de enterrio (NARWAL; SINDEL, JESSOP, 2008). De maneira similar, redução na viabilidade foi reportado em *C. bonariensis* (L.) Cronq. onde 59% foi perdida em período inferior a 360 DAE (VARGAS et al., 2018).

Para a percentagem de sementes dormentes viáveis houve redução significativa até 60 DAE em todas as profundidades testadas onde apenas 14% das sementes foram diagnosticadas como dormentes viáveis nas profundidades de enterrio até 10cm (Figura 26A). Entretanto, a manutenção das sementes na camada superficial favorece a superação da dormência e aumenta a percentagem de sementes dormentes não viáveis comparado ao enterrio em profundidades superiores a 5cm (Figura 26B). Em sistemas agrícolas, a manutenção das sementes na camada superficial proporciona ambientes mais favoráveis para a manipulação do banco de sementes de plantas daninhas, favorecendo a germinação e processos biológicos como deterioração e predação (GOGGIN; POWLES; STEADMAN, 2012; YAMASHITA et al., 2016). Todavia, a dinâmica dos bancos de sementes do solo para plantas daninhas é complexa devido interação dos fatores intrínsecos de cada espécie (dormência), condições do ambiente (luz, temperatura, umidade), processos biológicos (predação e alelopatia) e práticas de manejo (preparo do solo) que contribuem para mudanças de longevidade e viabilidade das sementes no tempo (GRAEBER et al., 2012; NÉE; XIANG; SOPPE, 2017).

Para a maioria das plantas daninhas, a superação da dormência primária após a dispersão das sementes da planta-mãe é considerada a primeira barreira para desencadear o processo germinativo e, podendo envolver fatores endógenos como embrião imaturo, balanço hormonal e outros reguladores específicos em nível transcricional que alteram o nível de dormência (GRAEBER et al., 2012). Além disso, a ausência de condições ambientais favoráveis para germinação e desenvolvimento podem induzir a dormência secundária possibilitando o aumento da longevidade,

especialmente para sementes alocadas em maiores profundidades do solo (NAMBARA et al., 2010). Em *L. rigidum* Gaudin., a superação da dormência envolve a regulação da sensibilidade ao ABA que permite respostas a estímulos de temperatura e luz (GOGGIN et al., 2015).

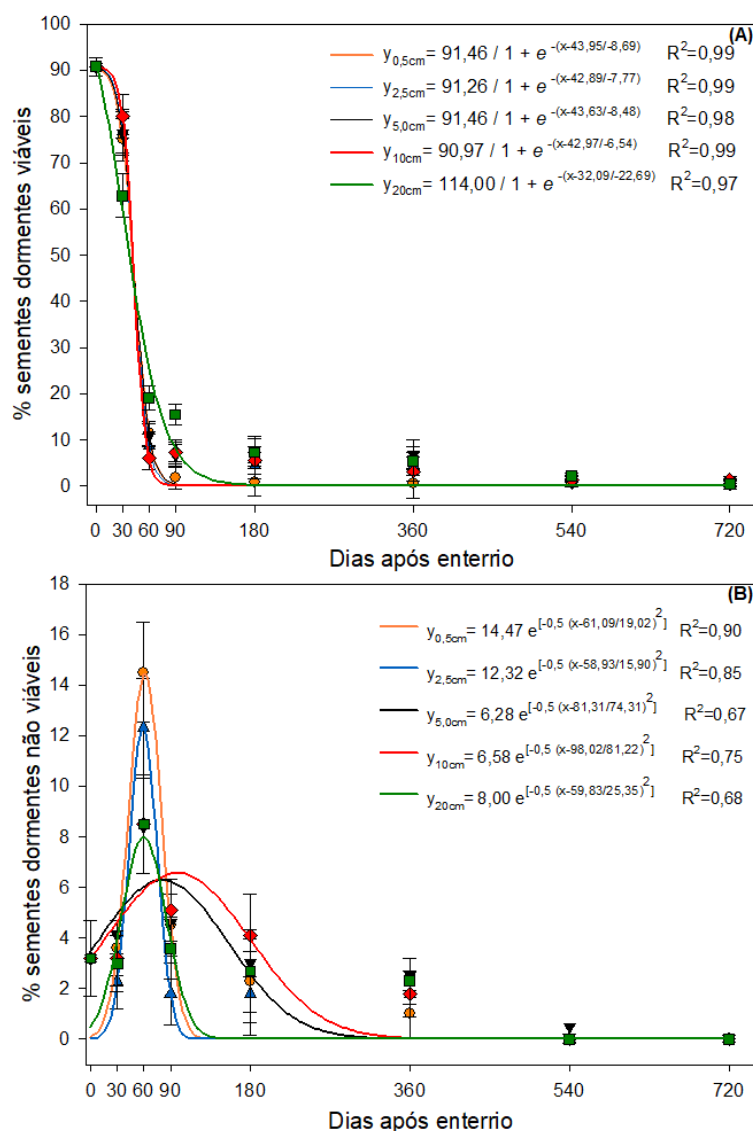


Figura 14- Percentagem de sementes dormentes viáveis (A) e dormentes não-viáveis (B) avaliado em diferentes tempos e profundidades de enterrio. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019. Os pontos representam a média das repetições e, as barras, corresponde a diferença mínima significativa em cada tempo avaliado ($p < 0,05$).

A baixa viabilidade das sementes de azevém no solo e sua manutenção em camadas mais superficiais são características importantes que devem ser consideradas na elaboração de práticas de manejo eficientes para redução dos

bancos de sementes do solo devido a maior exposição das sementes para deterioração e germinação comparada as camadas mais profundas do perfil do solo.

4.3.2 Germinação e quantificação dos hormônios da dormência em sementes de *Lolium multiflorum* Lam no tempo.

Para a quantificação dos fitohormônios (fitoreguladores) ABA, AIA e GA₃, as características de cada composto bem como o cromatograma demonstrando o tempo de retenção da amostra estão apresentados abaixo (Tabela 11, Figura 27).

Tabela 11- Características dos compostos analisados em amostras de azevém. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019.

Composto*	Fórmula molecular [M-H] ⁻	Massa teórica	Massa experimental	Tempo de retenção	Erro (ppm)
ABA	C ₁₅ H ₁₉ O ₄	263,129	263,129	8,04	2
AIA	C ₁₀ H ₈ NO ₂	174,056	174,053	7,09	5,8
GA ₃	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	346,379	346,373	5,40	

*Padrões analíticos obtidos na SigmaAldrich com 99,9% de pureza.

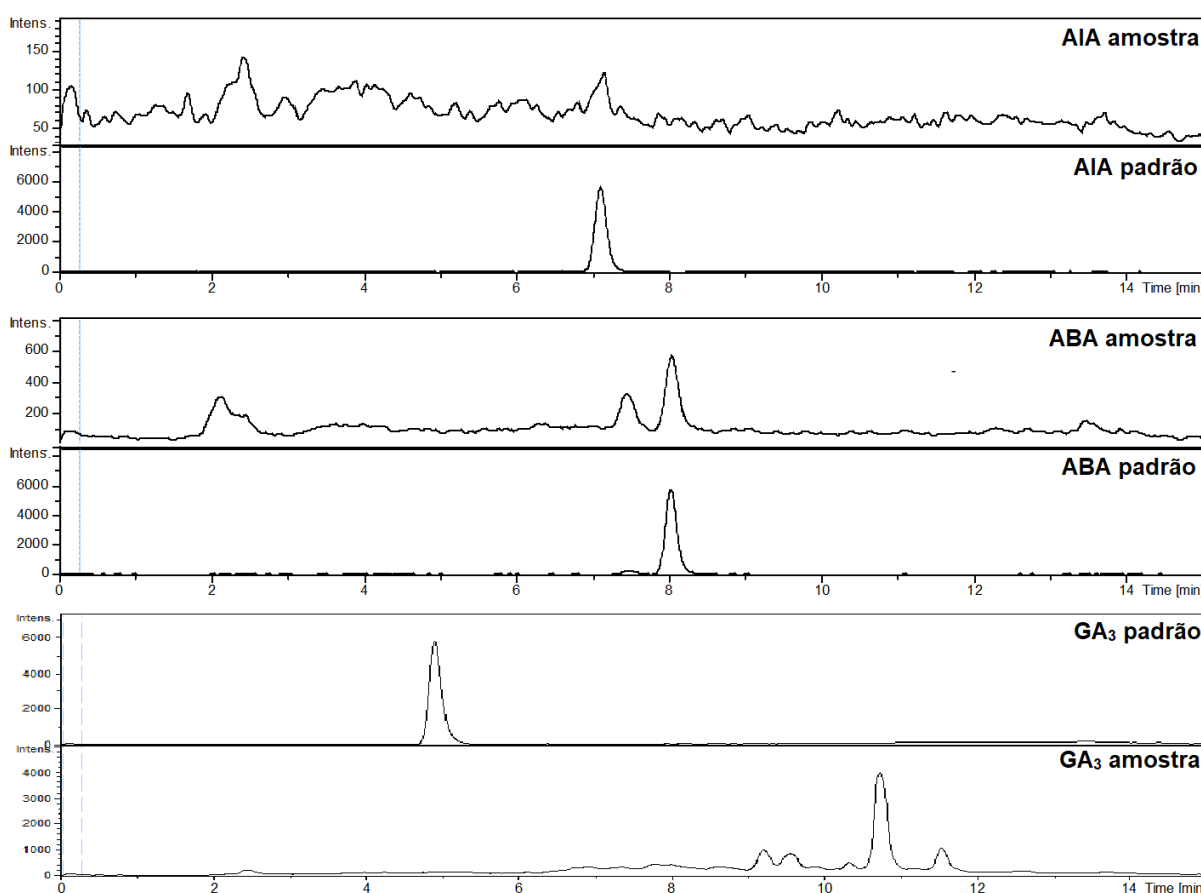


Figura 15- Representação do cromatograma para os hormônios da dormência AIA, ABA e GA₃ avaliados em sementes de azevém com seus respectivos controle. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019.

A análise não demonstrou necessidade de transformação dos dados com efeito significativo para o fator tempo de coleta em todas as variáveis avaliadas no teste de germinação das sementes e, diferença significativa apenas para a quantificação do AIA na dormência (Figura 28).

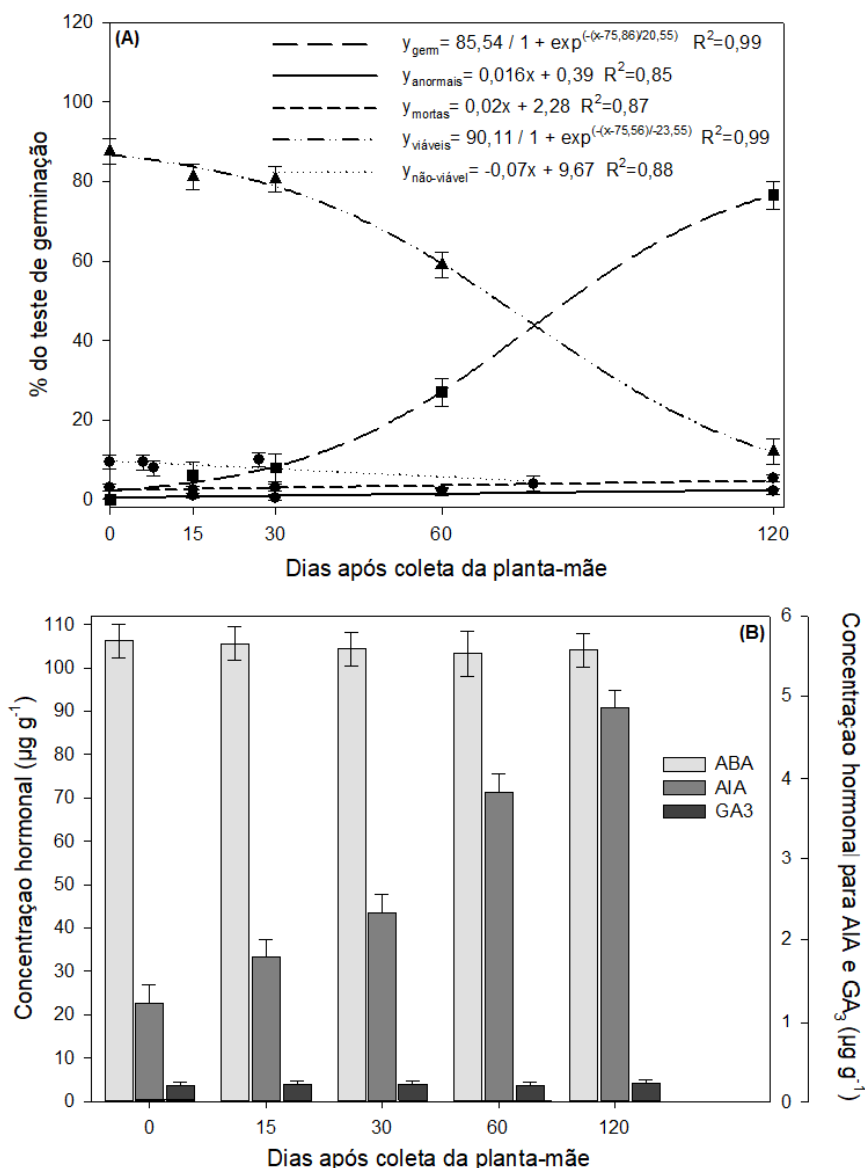


Figura 16- Percentagem das variáveis do teste de germinação (A) concentração hormonal (B) das sementes de azevém avaliado nos tempos zero, 15, 30, 60 e 120 dias após coleta da planta-mãe. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019. Os pontos representam os valores médios das repetições e, as barras, corresponde a diferença mínima significativa em cada tempo avaliado ($p < 0,05$).

Os resultados do teste de germinação evidenciaram elevado nível de dormência das sementes de azevém nas avaliações realizadas até 30 dias após coleta da planta-mãe, com redução significativa nos demais tempos onde menos de 20% das sementes ainda permaneceram dormentes viáveis aos 120 dias (Figura

28A). No entanto, a germinação das sementes foi inversamente proporcional a dormência com aumento significativo entre 30 e 120 dias após a coleta da planta-mãe, onde os valores de germinação variaram de 10 a 80%, respectivamente (Figura 28A). Além disso, a percentagem de plântulas anormais, sementes mortas e dormentes não-viáveis foi similar entre os tempos avaliados onde os valores foram inferiores a 10% (Figura 28A).

O aumento da germinação no tempo devido a redução da dormência evidenciou que a superação da dormência das sementes do azevém envolve possivelmente a maturidade fisiológica do embrião e efeitos da regulação hormonal. Para plantas daninhas, a dormência das sementes é um processo importante do ciclo de vida pois regula a germinação ao longo do tempo e, impede o estabelecimento sob condições inadequadas (MATILLA; CARRILLO-BARRAL; RODRIGUEZ-GACIO, 2015). O impedimento da germinação em diversos cereais tem sido atribuído a presença de proteínas inibidoras da α -amilase dependentes de ácido giberélico produzido no eixo embrionário como ativador primário (CASTRO; BRADFORD; HILHORST, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Ao avaliar a concentração hormonal das sementes de azevém, os resultados evidenciaram que os níveis de ABA foram superiores a $105 \mu\text{g g}^{-1}$ em todos os tempos avaliados enquanto que, para AIA, os valores de concentração aumentaram em torno de 400% ao longo do tempo avaliado após coleta, sendo diretamente proporcional a germinação das sementes (Figura 28B). No entanto, para GA_3 , não foi constatado aumento significativo de concentração nas sementes de azevém no intervalo compreendido entre zero e 120 dias após coleta da planta-mãe, onde os valores foram inferiores a $0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ (Figura 28B). Durante o desenvolvimento da semente, o ABA desempenha papel importante na regulação da maturação da semente e na transição entre a fase do embrião e plântula (HOLDSWORTH et al., 2008). Além disso, o ABA e o GA_3 são hormônios antagônicos que atuam em diversos processos fisiológicos e na sinalização para a manutenção da dormência ou promoção da germinação (GRAEBER et al., 2012; NÉE; XIANG; SOPPE, 2017). Entretanto, os resultados deste estudo não evidenciaram alterações na concentração de GA_3 nas sementes de azevém nos diferentes tempos, mas aumento significativo na concentração de AIA. Todavia, ação regulatória do ABA e das auxinas na dormência das sementes indicam que sua atuação é interdependente (LIU et al., 2013). A interação das auxinas com ABA no controle da

dormência das sementes ocorre pela inativação de repressores envolvidos na sinalização e na dormência das sementes (LIU et al., 2013). Em baixos níveis, o AIA inativa a expressão de ABA induzindo a liberação da dormência e a promoção da germinação das sementes. Em geral, os resultados evidenciaram que a dormência primária do azevém foi superada aos 120 dias após coleta da planta-mãe com aumento gradual nos níveis de AIA ao longo do tempo avaliado. Todavia, a dormência das sementes no campo é complexa devido sua interação com o ambiente e diversos fatores de regulação molecular envolvidos no estímulo a germinação.

4.3.3 Germinação de sementes dormentes de *Lolium multiflorum* Lam. com nitratos e reguladores endógenos.

A análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk não evidenciou a necessidade de transformação dos dados e, para a análise de variância, foi constatado efeito significativo apenas para as concentrações usadas dos promotores de germinação (Figura 29). Os resultados obtidos para as sementes dormentes e não dormentes de azevém não evidenciaram aumento significativo na percentagem de germinação, plântulas anormais, sementes mortas, dormentes viáveis e dormentes não viáveis, independente da concentração do promotor endógeno utilizado (Figura 29A e 29B). Entretanto, resultados de pesquisa demonstraram o efeito do nitrato de potássio e sais de amônia na promoção da germinação de sementes de *Amaranthus albus* L. e *E. crusgalli* [L.] Beauv. (HENDRICKS; TAYLORSON, 1974).

As principais evidências sobre o papel dos nitratos na promoção da germinação envolvem processos de oxidação do NADPH durante na rota das pentoses para metabolismo de carboidratos e na indução da expressão de genes repressores de ABA em sementes dormentes (YAN et al., 2016; NONOGAKI; NONOGAKI, 2017). Em diversas espécies de plantas daninhas, o ABA atua como o principal regulador da dormência podendo ser alterado pela através do balanço com giberelinas ou por nitratos que agem sobre os processos fisiológicos da dormência (NAMBARA et al., 2010; GRAEBER et al., 2012).

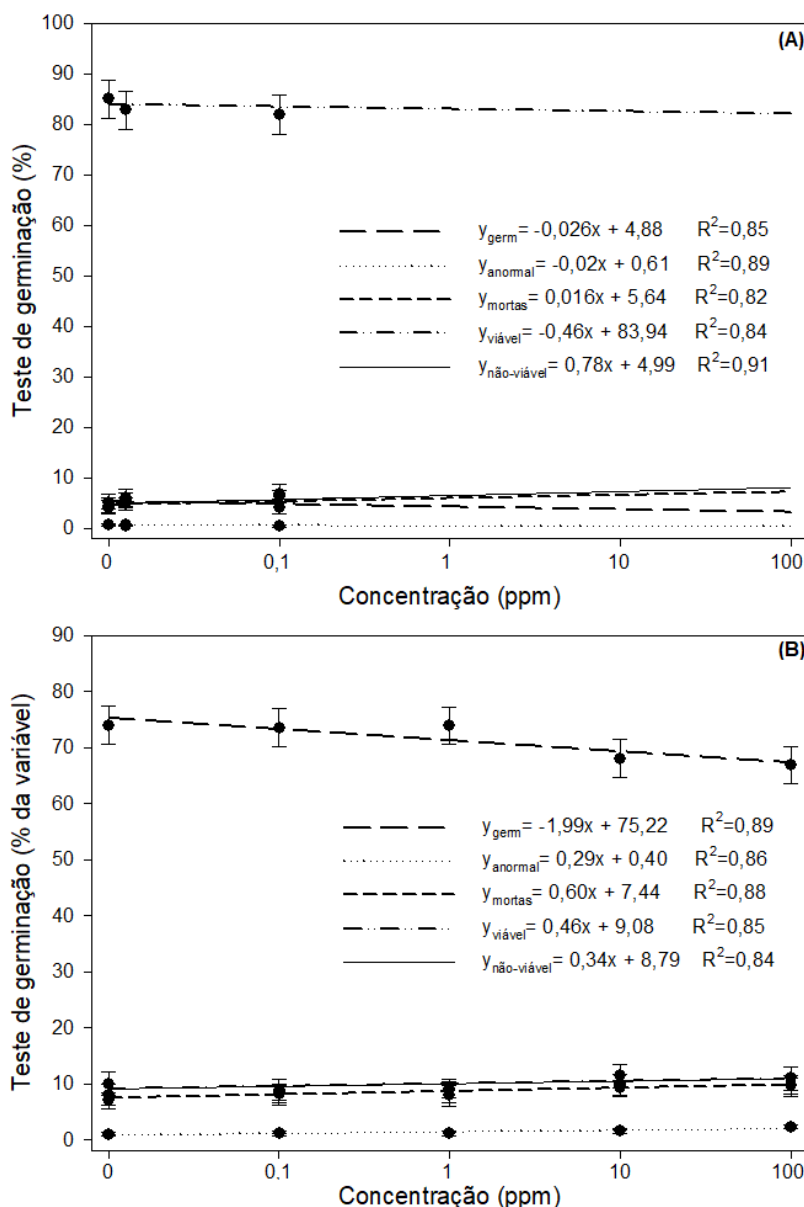


Figura 17- Teste de germinação em sementes dormentes (A) e não dormentes (B) de avevém em função do uso de promotores da germinação. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019. Os pontos representam os valores médios das repetições e, as barras, corresponde a diferença mínima significativa ($p < 0,05$).

Os resultados deste estudo não evidenciaram alterações na percentagem de germinação de sementes de avevém dormentes ou não dormentes em função da utilização de promotores da germinação, demonstrando que os níveis de dormência logo após liberação da planta-mãe são elevados e envolvem possivelmente a maturação do embrião e outros aspectos moleculares não identificados como regulação gênica, visto que o tratamento padrão com estratificação a frio não alterou os níveis de germinação comparado aos promotores.

4.3.4 Potencial supressor das culturas de inverno sobre o azevém em áreas agrícolas do Sul do Brasil.

A análise de variância demonstrou efeito significativo na supressão e no banco de sementes de azevém após manejo invernal com culturas supressoras ao longo do período avaliado para todas as variáveis (Figura 30, 31 e 32). Os resultados evidenciaram redução significativa na população do azevém após manejo contínuo com ervilhaca, centeio, nabo ou aveia-preta comparado ao pousio invernal ou manejo com canola onde houve aumento médio de 6% ao ano (Figura 30A).

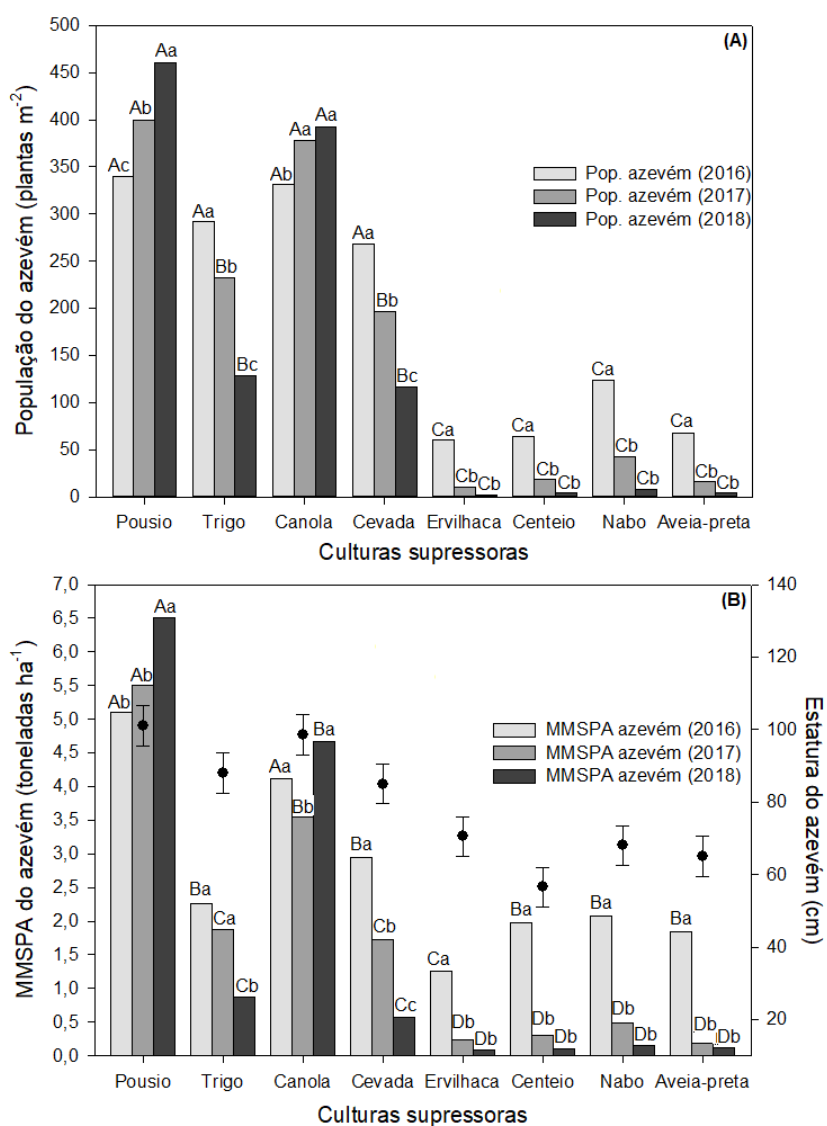


Figura 18- População (A), massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e estatura do azevém (B) em função das culturas de supressão. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019. Letras maiúsculas comparam culturas dentro de ano e, letra minúscula, comparam anos dentro de culturas pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$). Os pontos, representam a estatura do azevém para cada cultura supressora com a diferença mínima significativa ($p < 0,05$).

Para áreas manejadas com trigo e cevada, a redução na população de azevém ocorreu mais lentamente, atingindo valores 70% menores na comparação com o pousio após três anos de manejo (Figura 30A). De maneira similar, o manejo cultural com ervilhaca, centeio, nabo ou aveia-preta bem como para áreas manejadas com trigo ou cevada proporcionaram redução significativa da MMSPA do azevém comparado ao pousio invernal (Figura 30B). Todavia, a estatura do azevém foi menos afetada pela presença das culturas de supressão, com redução significativa após uso de centeio e aveia-preta (Figura 30B).

Ao avaliar a população, a MMSPA e a estatura das culturas, os resultados evidenciaram que as culturas gramíneas (trigo, cevada, centeio e aveia-preta) apresentaram maior densidade populacional comparado as demais espécies supressoras (Figura 31A). Todavia, as principais culturas de supressão apresentaram maior acúmulo de MMSPA e estatura de plantas comparado a espécies onde a supressão do azevém foi baixa (Figura 31B). Para centeio e aveia-preta, os valores médios de MMSPA foram superiores a 9,5 toneladas ha⁻¹ enquanto que a estatura das plantas foi superior a 112cm. No entanto, a utilização de canola, trigo ou cevada como culturas supressoras sem a complementação com herbicidas exerceu efeito reduzido sobre a população de azevém devido ao menor acúmulo de MMSPA e estatura de plantas. Para isso, é necessário escolher adequadamente a espécie levando em conta sua habilidade de competição visto que quantidades similares de palha poderão resultar em respostas distintas na supressão de uma mesma espécie (CORREIA; DURIGAN; KLINK, 2006; MORAES et al., 2009).

A supressão de plantas daninhas com espécies de cobertura de solo que apresentem alta produção de massa seca podem reduzir a germinação e o desenvolvimento de plantas daninhas (BALBINOT JR; MORAES; BACKES, 2007) além de contribuir na redução do banco de sementes (DAVIS; CARDINA; FORCELLA, 2005; MAIA et al., 2009; MIRSKY et al., 2010). No entanto, o momento da emergência de plantas daninhas em relação à cultura exerce grande influência no potencial competitivo (JAKELAITIS et al., 2006). Elevada habilidade competitiva do azevém foi observada quando em competição com a cevada diminuindo a medida que planta daninha e cultura emergem juntas (TIRONI et al., 2014). Sistemas de rotação e/ou sucessão de culturas após a colheita da soja devem ser considerados no manejo integrado para redução da infestação, desenvolvimento e proliferação de plantas daninhas (CASTRO et al., 2011).

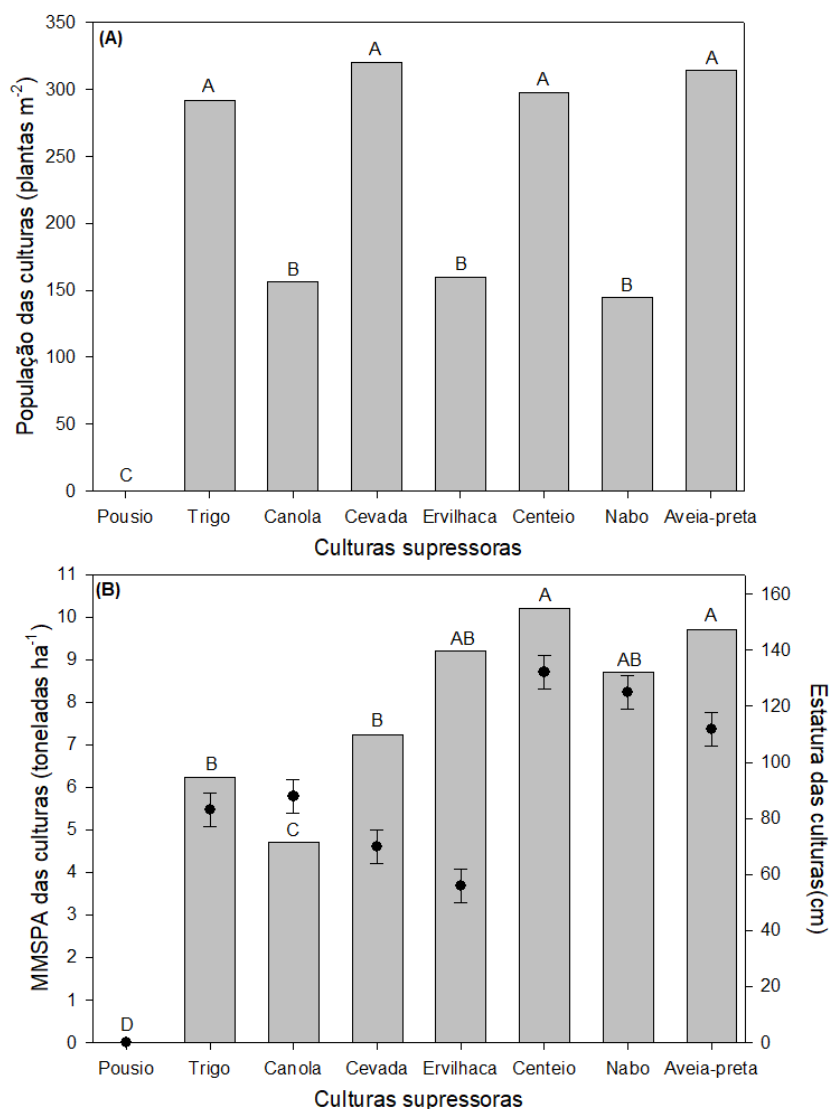


Figura 19- População (A), massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e estatura das culturas (B) usadas para supressão do azevém. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019. Letras maiúsculas comparam culturas dentro de ano e, letra minúscula, comparam anos dentro de culturas pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$). Os pontos, representam a estatura das culturas supressoras com a diferença mínima significativa ($p < 0,05$).

Para o banco de sementes do solo, os resultados evidenciaram que houve redução significativa na camada de 0-5cm após a utilização das culturas de supressão comparado ao banco de sementes inicial do solo e ao pousio invernal, exceto para canola onde houve aumento superior a 120% no banco de sementes ao longo do período avaliado (Figura 32A). Os métodos de controle não químicos baseados na supressão de plantas daninhas por culturas auxiliam fortemente na redução dos bancos de sementes do solo devido a criação de ambientes desfavoráveis para germinação e estabelecimento (SHANER; BECKIE, 2014).

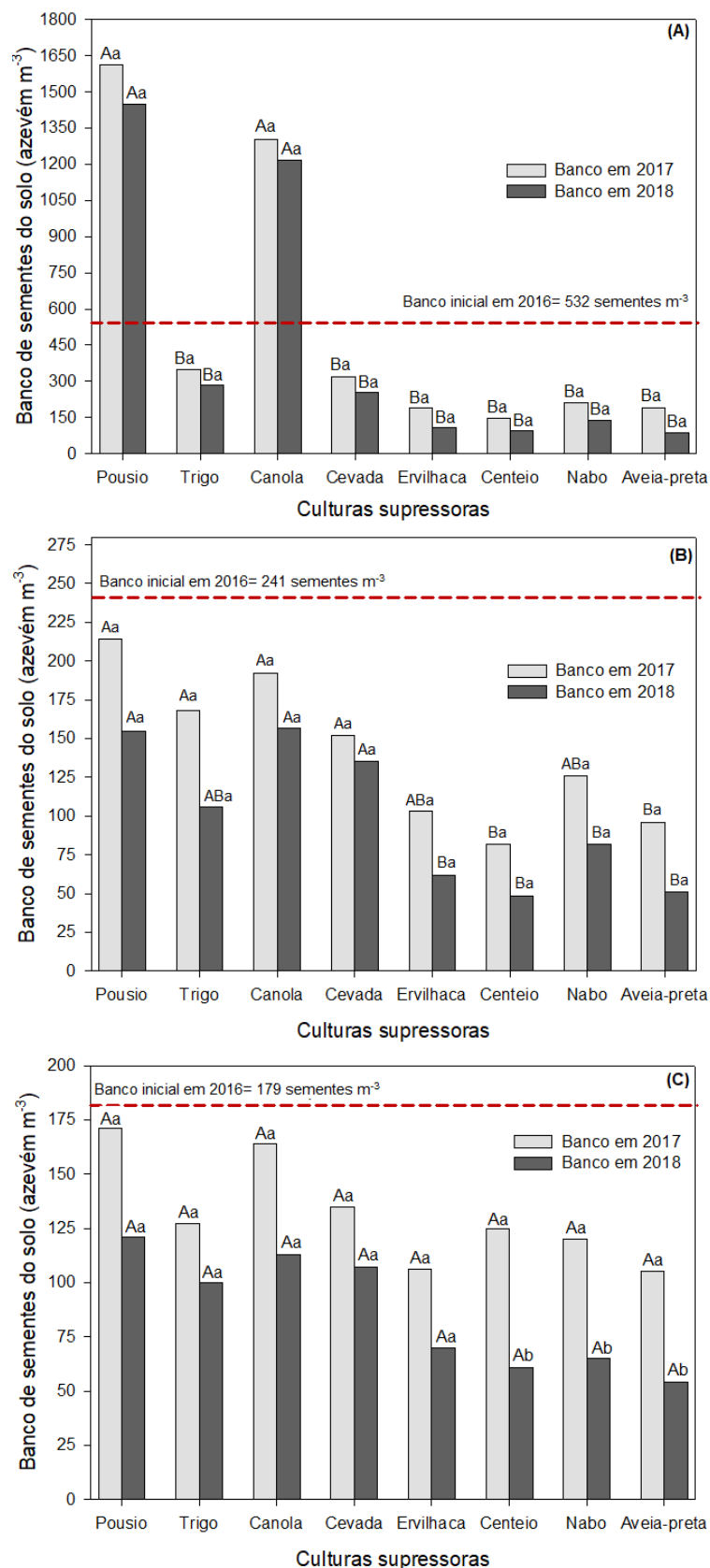


Figura 20- Banco de sementes de azevém na camada de 0-5cm (A), 5-10cm (B) e 10-20cm (C) em função da utilização de culturas de supressão ao longo do tempo. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2019. Letras maiúsculas comparam culturas dentro de ano e, letra minúscula, comparam anos dentro de culturas pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$).

Para culturas onde as opções de manejo são limitadas como o trigo, a maior habilidade competitiva das culturas supressoras como centeio, aveia-preta, ervilhaca e nabo podem ser consideradas uma oportunidade de manejo muito importante para a redução dos bancos de sementes do solo e prevenir futuras infestações de azevém. Estudos tem reportado que as culturas de cobertura de solo podem reduzir entre 40 a 78% o banco de sementes do solo dependendo da espécie avaliada no período de um ano (TEASDALE et al., 2004; DAVIS; CARDINA; FORCELLA, 2005; BAJWA; WALSH; CHAUHAN, 2017).

Para o banco de sementes de azevém avaliado na camada de 5-10cm, os resultados evidenciaram reduções significativas apenas para áreas manejadas com centeio e aveia-preta comparado aos demais manejos preconizados durante o período invernal durante o triênio avaliado (Figura 32B). Para a camada de 10-20cm, a redução média do banco de sementes do solo para azevém com a culturas de supressão variou de 18 a 25% ao ano dependendo da cultura comparado ao banco inicial e ao pousio invernal, não diferindo estatisticamente entre si (Figura 32C). As reduções menos expressivas no banco de sementes de azevém evidenciados para profundidades maiores que 5cm deve-se a ausência de revolvimento do solo e baixa viabilidade das sementes, conforme já demonstrado anteriormente. Cabe ressaltar ainda, que a atividade microbiana e a predação envolvidos na deterioração das sementes diminui significativamente com o aumento da profundidade onde as condições de temperatura e oxigênio são limitantes (YAMASHITA et al., 2016; VARGAS et al., 2018).

Com a evolução da resistência de plantas daninhas a herbicidas, as plantas de solo devem ser preconizadas como ferramentas potenciais para redução da realimentação dos bancos de semente e redução dos impactos negativos das plantas daninhas sobre as culturas (EVANS et al., 2016). Os resultados do banco de sementes e população infestante obtidas neste estudo demonstraram a importância da utilização de culturas supressoras durante o período invernal, especialmente com espécies de rápido crescimento inicial, alta produção de matéria seca e estatura como demonstrado para centeio, ervilhaca e aveia-preta. Além disso, as estratégias de manejo para as culturas com potencial supressor podem ser executadas de maneira contemplar através da utilização de herbicidas alternativos na pós e pré-emergencia, desde que seja considerado sua seletividade e eficácia no controle de azevém resistente.

4.3.5 Herbicidas pré-emergentes na cultura do trigo para manejo de *Lolium multiflorum* Lam. resistente ao glifosato.

A análise de variância evidenciou efeito significativo para todas as variáveis analisadas sem a necessidade de transformação de dados (Tabela 12 e 13, Figura 33). Os resultados obtidos evidenciaram que a aplicação de clomazone seguido dos tratamentos com atrazina e oxifluorfen proporcionaram maior fitotoxicidade ao trigo comparado a testemunha sem herbicida com 64 e 45% aos 7 DAE, respectivamente (Tabela 12). De maneira similar, a injúria causada pelos herbicidas clomazone e atrazina foram elevadas nas demais avaliações de fitotoxicidade com níveis superiores a 62, 88 e 85% aos 14, 28 e 56 DAE, respectivamente.

Tabela 12- Fitotoxicidade dos herbicidas pré-emergentes aplicados na cultura do trigo para controle de azevém. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2019.

Tratamento	Dose ia ha ⁻¹	Fitotoxicidade (%)			
		7 DAE	14 DAE	28 DAE	56DAE
Pendimetalina	1000	14 C	8,0 D	7,0 E	2,0 F
Trifluralina	1500	41 B	34 B	19 D	12 E
Isoxaflutole	75	8,0 D	5,0 D	2,0 E	1,0 F
Clomazone	612	64 A	78 A	91 A	85 B
Alachlor	2400	16 C	11 C	9,0 E	6,0 F
Piroxasulfone	100	9,0 D	7,0 D	5,0 E	3,0 F
S-metolachlor	1440	22 C	18 C	15 D	10 E
Sulfentrazone	500	35 B	40 B	65 B	50 C
Oxadiazon	625	37 B	31 B	32 C	26 D
Oxifluorfen	600	45 B	42 B	48 C	31 D
Atrazina	2000	45 B	63 A	88 A	98 A
Diuron	1250	12 D	10 C	6,0 E	4,0 F
Metribuzin	144	14 C	9,0 C	5,0 E	2,0 F
Limpa	--	0,0 E	0,0 D	0,0 E	0,0 F
Suja	--	0,0 E	0,0 D	0,0 E	0,0 F
C.V. (%)		21,11	19,91	18,40	12,10

*médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Resultados recentes reportaram que o uso de clomazone na dose de 400 g ia. ha⁻¹ na cultura do trigo apresentou baixa seletividade e níveis de injúrias acima de 80% dependendo da cultivar (GALON et al., 2015). A baixa seletividade para atrazina na cultura do trigo deve-se a ausência e/ou reduzida capacidade de detoxificação e aumento significativo do estresse oxidativo seguido de inibição da atividade fotossintética e fixação de carbono (BUONO et al., 2011). Entretanto, o

herbicida piroxasulfone e isoxaflutole aplicado na pré-emergência do trigo foram considerados os mais seletivos a cultura com níveis de fitotoxicidade inferiores a 9% em todas as épocas avaliadas (Tabela 12).

Tabela 13- Controle (%) de azevém com herbicidas pré-emergentes aplicados na cultura do trigo. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019.

Tratamento	Dose ia ha ⁻¹	Controle (%)			
		7 DAE	14 DAE	28 DAE	56 DAE
Pendimetalina	1000	59 E	62 D	56 D	45 D
Trifluralina	1500	85 C	85 C	80 B	80 B
Isoxaflutole	75	11 F	5,0 F	3,0 F	1,0 F
Clomazone	612	90 B	91 B	94 A	88 B
Alachlor	2400	92 B	91 B	94 A	92 A
Piroxasulfone	100	93 B	94 A	95 A	94 A
S-metolachlor	1440	92 B	91 B	94 A	93 A
Sulfentrazone	500	85 C	85 C	88 B	82 B
Oxadiazon	625	79 D	78 C	75 C	86 B
Oxifluorfen	600	81 C	82 C	79 C	70 C
Atrazina	2000	75 D	86 C	89 B	97 A
Diuron	1250	43 E	50 D	29 E	16 E
Metribuzin	144	14 F	27 E	21 E	6,0 F
Limpa	--	100 A	100 A	100 A	100 A
Suja	--	0,0 G	0,0 F	0,0 F	0,0 F
C.V. (%)		11,57	11,18	10,04	8,19

*médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Em plantas suscetíveis, o piroxasulfone atua inibindo a elongação de ácidos graxos de cadeia longa (>18 átomos de carbono), especialmente o ácido esteárico localizado no retículo endoplasmático e no cloroplasto (TANETANI et al., 2009). A seletividade no trigo deve-se a metabolização do herbicida através da glutathione S-transferase onde os efeitos podem ser distintos dependendo da dose utilizada, da textura do solo e do teor de matéria orgânica (KNEZEVIC et al., 2009; WALSH et al., 2011). Para o isoxaflutole, a inibição da enzima 4-hidroxifenil piruvato dioxigenase (HPPD) afeta a biossíntese de plastoquinona causando branqueamento dos tecidos e morte de plantas, exceto para plantas tolerantes onde ocorre aumento da metabolização (PALLETET et al., 1997).

Os resultados evidenciaram que a aplicação de piroxasulfone, alachlor, s-metolachlor e clomazone proporcionou níveis de controle superiores a 90%, seguido de trifluralina e sulfentrazone com 85% aos 7 DAE (Tabela 13). Resultados semelhantes foram obtidos em aplicações de s-metolachlor e piroxasulfone na dose

de 1790 e 160 g ia. ha⁻¹ na cultura do trigo onde os níveis de controle de azevém resistente ao glifosato foram superiores a 90% (BOND et al., 2014).

Ao avaliar a eficácia dos herbicidas aos 14, 28 e 56 DAE, os resultados demonstraram que os melhores tratamentos para controle de azevém na pré-emergência foram piroxasulfone, alachlor, s-metolachlor, clomazone e atrazina com níveis de controle superiores a 86% e similares ao controle da testemunha capinada em todas as épocas avaliadas (Tabela 13). Os resultados deste estudo corroboram com os elevados níveis de controle de azevém obtidos em lavouras de trigo da Austrália após a aplicação na pré-emergência de atrazina, piroxasulfone e s-metolachlor onde a eficácia foi superior a 85%, sendo considerados herbicidas importantes para manejo de populações azevém com resistência múltipla (WALSH et al., 2011; BOUTSALIS; GILL; PRESTON, 2014).

A avaliação da população de azevém e de trigo demonstrou apenas os herbicidas piroxasulfone e alachlor proporcionaram elevada redução no número de plantas de azevém m⁻² sem afetar a população do trigo aos 56 DAE (Figura 33A e 33B). Cabe ressaltar que os critérios para o uso destes herbicidas no controle de azevém deve considerar sua seletividade ao trigo ou a outras culturas de interesse, de modo que possam ser utilizadas de maneira eficiente no manejo da resistência. Em trabalho conduzido em lavouras de trigo da Austrália foi evidenciado elevada eficácia do herbicida piroxasulfone na dose de 42 g i.a. ha⁻¹ no controle de *L. rigidum* Gaudin. resistente a diferentes herbicidas, além de apresentar elevada seletividade para trigo e centeio dependendo da dose utilizada (WALSH et al., 2011).

Já para atrazina, foi constatado redução de mais 92% na população de azevém e de trigo comparado a testemunha limpa, demonstrando que o herbicida não deve ser considerado no manejo de azevém em trigo (Figura 33). Todavia, o herbicida pode ser uma opção importante para controle de azevém em lavouras de canola tolerante a herbicidas do grupo das triazinas devido sua seletividade (SAINI et al., 2014). Além disso, o uso de herbicidas com mecanismos de ação distinto e culturas pode contribuir para manejo da evolução da resistência com redução significativa na realimentação do banco de sementes do solo (COLLAVO; STREK; BEFFA, 2013). Resultados similares foram reportados para biótipos resistentes de *L. rigidum* Gaudin. onde o uso de herbicidas alternativos pode reduzir entre 50 a 99% o banco de sementes do solo para áreas manejadas por até dois anos (FERNÁNDEZ-MORENO et al., 2017).

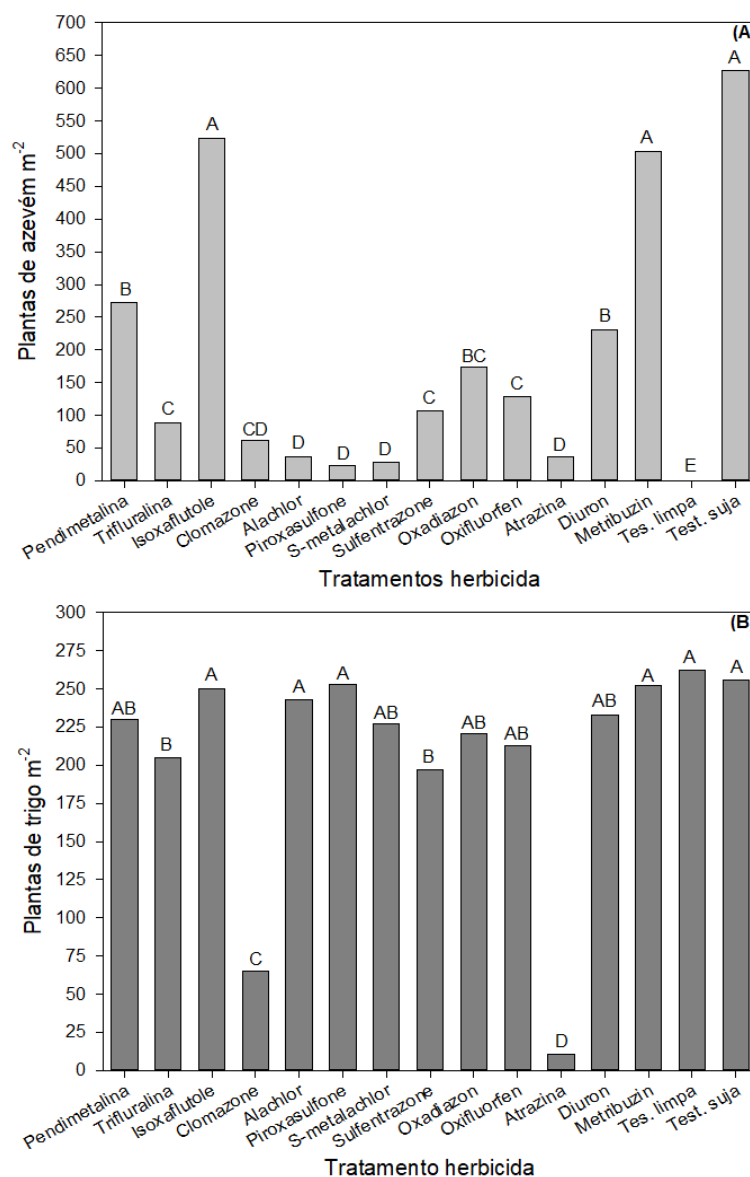


Figura 21- População de azevém (A) e trigo (B) em função da aplicação dos herbicidas pré-emergentes aos 56 DAE. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019. Mesma letra maiúscula não difere estatisticamente pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Os resultados de produtividade evidenciaram que os melhores tratamentos herbicidas foram piroxasulfone, alachlor e s-metolachlor com mais de 2400 Kg ha⁻¹, não diferindo estatisticamente da testemunha limpa (Figura 34). Resultados similares foram encontrados após a aplicação na pré-emergência do trigo dos herbicidas piroxasulfone e s-metolachlor nas doses de 100 e na 280 g ia. ha⁻¹ onde a produtividade superior a 2500 Kg ha⁻¹ (BOUSALIS; GILL; PRESTON, 2014). Entretanto, a redução na emergência de plântulas de trigo após a aplicação de s-metolachlor e piroxasulfone depende da dose utilizada, podendo causar redução na produtividade mesmo quando há controle adequado do azevém.

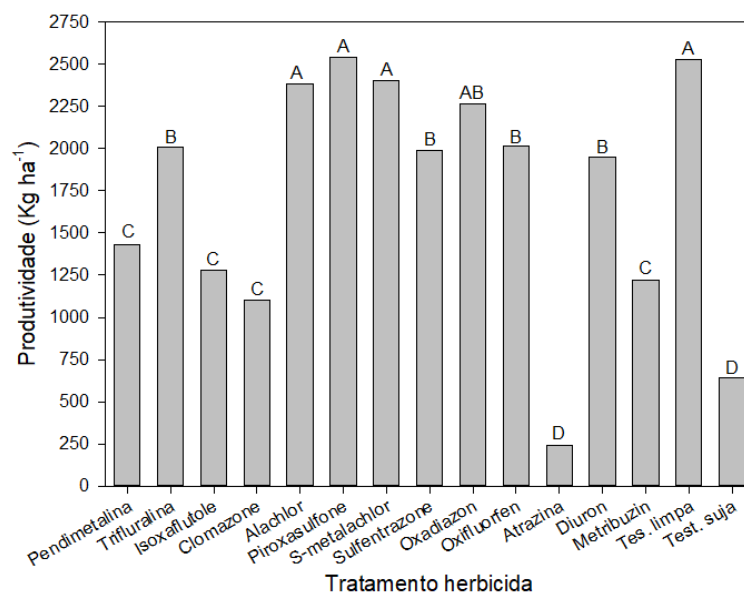


Figura 22- Produtividade (Kg ha⁻¹) do trigo em função da aplicação de herbicidas pré-emergentes para controle de azevém. FAEM/UFPeI, Capão do Leão/RS, 2019. Mesma letra maiúscula não difere significativamente pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Resultados semelhantes foram encontrados em nosso estudo após aplicação de trifluralina onde o controle de azevém foi superior a 85% com redução de 20% na população do trigo, acarretando em produtividade menor comparado ao herbicida piroxasulfone e a testemunha limpa (Figura 34). Dessa forma, o manejo de biótipos resistentes a herbicidas em áreas cultivadas com trigo pode ser realizado com herbicidas pré-emergentes como piroxasulfone e alachlor que apresentaram seletividade a cultura do trigo sem ocasionar redução significativa no stand inicial aliando elevado controle sobre o azevém, proporcionado maior produtividade comparado aos demais herbicidas testados.

4.3.6 Manejo do banco de sementes de azevém através de métodos físicos e mecânicos na pré-semeadura das culturas de verão.

O teste de normalidade não demonstrou a necessidade de transformação dos dados e, a análise de variância, evidenciou efeito significativo sobre o banco de sementes e a população infestante entre os manejos físicos e mecânicos e as culturas de verão em sucessão (Figura 35 e 36).

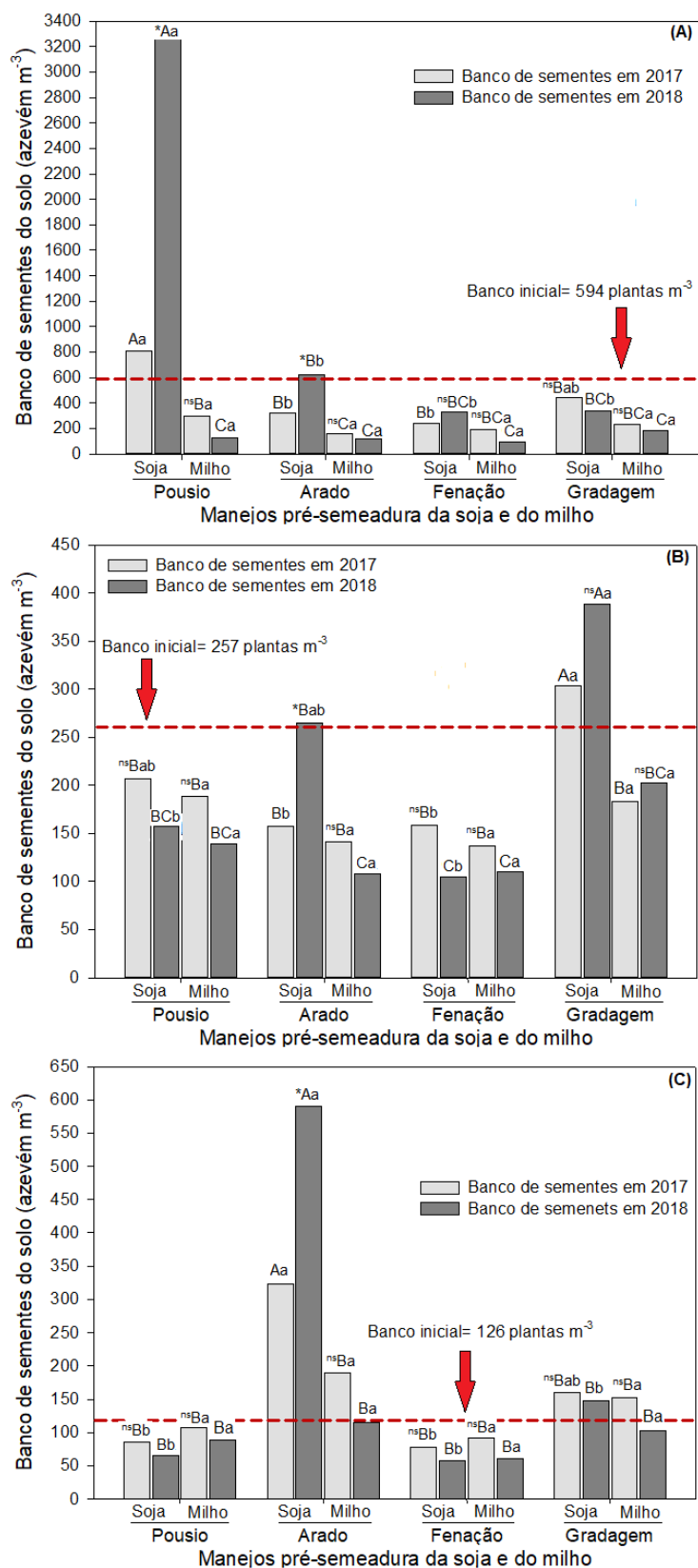


Figura 23- Banco de sementes de azevém na camada de 0-5cm (A), 5-10cm (B) e 10-20cm (C) em função dos manejos pré-plantagem da soja e do milho ao longo do tempo. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019. Letras maiúsculas comparam os manejos dentro de ano e, letra minúscula, compara manejo dentro de culturas no ano pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$); *significativo e ^{ns}não significativo para comparação de anos dentro de manejos pelo teste t ($p \leq 0,05$).

Os resultados do banco de sementes do solo na camada de 0-5cm evidenciaram que o pousio invernal seguido de soja proporcionou aumento significativo no número de sementes comparado aos demais manejos preconizados na pré-semeadura da soja ou do milho (Figura 35A). Ao comparar o efeito do tempo para o manejo adotado, houve diferença significativa apenas no pousio seguido de soja com aumento de 380% entre um ano e outro. Para o banco de sementes de azevém presente na camada de 5-10cm foi constatado aumento de 22 e 53% entre um ano e outro para áreas submetidas a gradagem superficial seguido do uso da soja como cultura sucessora de verão comparado ao banco inicial (Figura 35B).

A ausência de revolvimento do solo proporcionou reduções no banco de sementes do solo de até 50% na camada de 5-10cm comparado ao banco inicial após dois anos de manejo contínuo, independente da cultura usada em sucessão (Figura 35B). Para a camada de 10-20cm, os resultados evidenciaram aumento significativo no banco de sementes do solo em áreas submetidas a aração na pré-semeadura da soja comparado ao banco inicial do solo (Figura 35C). De maneira similar, houve redução no número de sementes de azevém na camada de 10-20cm para manejos sem revolvimento do solo ou com distúrbio superficial após gradagem, independente da cultura sucessora.

Em sistemas agrícolas, o preparo do solo e os distúrbios frequentes são considerados os principais fatores envolvidos na distribuição vertical das sementes de plantas daninhas comparado a semeadura direta onde a maioria das sementes permanece na superfície do solo (CLEMENTS; BENOIT; SWANTON, 1996). Resultados semelhantes foram encontrados em *Poa annua* L. em sistemas com inversão do solo onde a distribuição vertical foi mais uniforme comparado a semeadura direta sem inversão, contribuindo para evitar o estabelecimento de plântulas devido o enterrio de sementes a camadas onde as condições para germinação são desfavoráveis (SCHERNER; MELANDER; KUDSK, 2016). Além disso, o enterrio das sementes dificulta a germinação, aumenta a dormência e dificulta a manipulação do banco de sementes devido a redução da predação e deterioração (GOGGIN; POWLES; STEADMAN, 2012). Em recente pesquisa foi constatado que perturbações do solo podem auxiliar no controle de plantas daninhas, mas processos de aração podem aumentar a longevidade das sementes e reduzir a emergência das plântulas e manter as sementes viáveis por períodos maiores (MELANDER et al., 2013).

Para população de azevém, os maiores valores foram obtidos em áreas sob pousio invernal com sucedido de soja no verão, onde o aumento foi superior a 400% após dois anos de manejo contínuo (Figura 36). A aração do solo, fenação ou pousio invernal seguido do milho como cultura sucessora de verão foram manejos que reduziram a população de azevém em mais de 65% comparado a população infestante inicial. As principais evidências para redução da população do azevém estão relacionadas com a ausência/limitada realimentação do banco de sementes do solo, visto que a semeadura do milho geralmente ocorre 60-80 dias antes da cultura da soja. Resultados similares foram obtidos em sistemas de cultivo que utilizam o milho como cultura sucessora no verão onde a realimentação do banco de sementes do solo é menor devido a antecipação de semeadura comparado a soja (GALVAN et al., 2015; JHA et al., 2017).

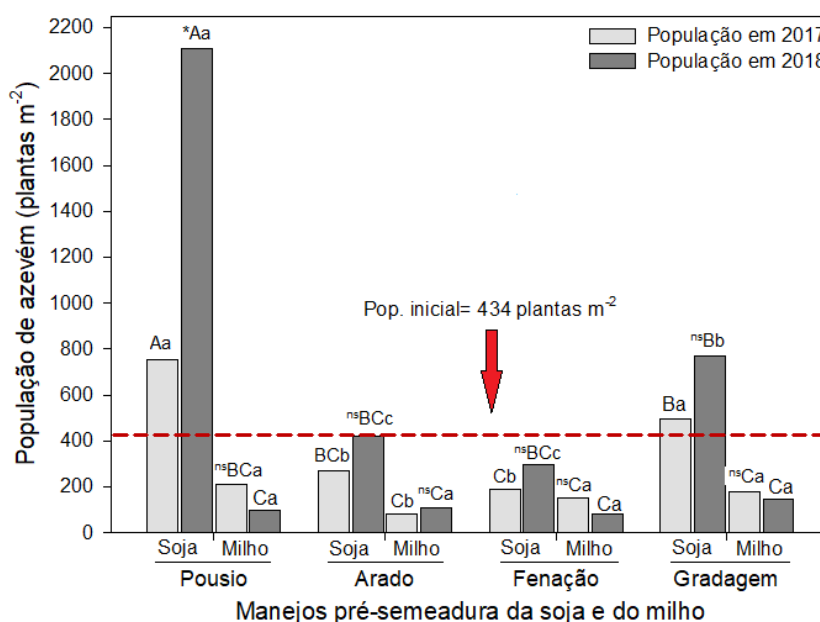


Figura 24- População de azevém em função dos manejos pré-semeadura da soja e do milho ao longo do tempo. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019. Letras maiúsculas comparam os manejos dentro de ano e, letra minúscula, compara manejo dentro de culturas no ano pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$); *significativo e ^{ns}não significativo para comparação de anos dentro de manejos pelo teste t ($p \leq 0,05$).

Em áreas cultivadas com soja, destacou-se a produção de feno como alternativa mais viável para redução da população de azevém onde os valores foram 30 e 85% menores comparado a população inicial e ao pousio invernal (Figura 36). Além disso, a produção de feno foi próxima a 5,7 toneladas ha⁻¹ de matéria seca (dados não apresentados) e o volumoso produzido a partir do azevém pode ser

considerado uma importante fonte energética para gado em períodos de menor disponibilidade alimentar (PEDROSO et al., 2004).

A utilização de arado ou gradagem na pré-semeadura da soja foi pouco eficiente na redução da população infestante comparada a população inicial, mas contribuiu significativamente na redução no número de plantas de azevém comparado ao pousio invernal (Figura 36). O manejo do solo com aração e/ou gradagem pode ser considerado uma oportunidade para controle de plantas daninhas, proporcionando redução na densidade de plantas daninhas em sistemas de cultivo (RENTON; FLOWER, 2015). No entanto, essas práticas de manejo isoladas tendem a ser limitadas para controle adequado de plantas daninhas, mas importantes em programas de manejo do banco de sementes de azevém que devem ser preconizadas para proteger o potencial produtivo das culturas, reduzir a pressão de seleção para resistência e manter a população infestante em níveis mais baixos (KLEEMANN; PRESTON; GILL, 2016; COLBACH et al., 2017). O uso do milho como cultura sucessora com semeaduras mais precoces, independente do manejo adotado auxilia na redução da população infestante e do banco de sementes. Dessa forma, práticas de manejo que proporcionem redução na realimentação do banco de sementes do solo são essenciais para reduzir a população infestante e evitar a evolução da resistência.

4.3.7 Inviabilização de sementes de *Lolium multiflorum* Lam. com herbicidas em diferentes estádios do período reprodutivo.

Os resultados para o teste de normalidade não demonstraram a necessidade de transformação dos dados e, a análise de variância, evidenciou efeito significativo entre os fatores tratamentos herbicidas e os diferentes estágios reprodutivos para todas as variáveis avaliadas, exceto para percentagem de plântulas anormais onde houve efeito simples para o fator tratamento herbicida (Tabela 14, Figura 37).

Os resultados evidenciaram rápido efeito dos herbicidas paraquate e glufosinato de amônia no controle de azevém independente do estágio aplicado onde os níveis foram superiores a 80% aos 7DAA (Tabela 14). Todavia, o controle foi 25 a 40% menor para as aplicações de cletodim e iodosulfuron-metil comparado aos demais herbicidas. Em plantas, o paraquat possui rápida ação herbicida devido o desvio de elétrons do fotossistema I (FS I) durante o processo fotossintético que

resultam na formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), causando peroxidação de lipídios e danos as membranas do cloroplasto (SENSEMAN, 2007).

Tabela 14- Controle (%) de azevém aos sete, 14 e 28 dias após aplicação (DAA) de paraquat, glufosinato de amônia, iodosulfuron-metil e cletodim para inviabilização das sementes em diferentes estádios reprodutivos. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019.

Tratamento	Dose (g ia. ha ⁻¹)	Controle 7DAA		
		Pré-espiga	Antese	Enchimento
Paraquat	200	84 Aa	82 Aa	80 Aa
Gluf. de amônia	400	82 Ba	81 Aa	82 Aa
Iodosulfuron-metil	5	44 Da	42 Ca	45 Ba
Cletodim	120	55 Ca	51 Ba	52 Ba
Testemunha	--	0,0 E ^{ns}	0,0 D	0,0 C
CV (%)		4,33		

Tratamento	Dose (g ia. ha ⁻¹)	Controle 14DAA		
		Pré-espiga	Antese	Enchimento
Paraquat	200	99 Aa	98 Aa	99 Aa
Gluf. de amônia	400	93 Ba	95 Aa	95 Aa
Iodosulfuron-metil	5	83 Ca	82 Ba	80 Ba
Cletodim	120	91 Ba	89 Ba	90 Ba
Testemunha	--	0,0 D ^{ns}	0,0 C	0,0 C
CV (%)		3,52		

Tratamento	Dose (g ia. ha ⁻¹)	Controle 28DAA		
		Pré-espiga	Antese	Enchimento
Paraquat	200	100 Aa	100 Aa	100 Aa
Gluf. de amônia	400	100 Aa	100 Aa	99 Aa
Iodosulfuron-metil	5	96 Ba	97 Ba	97 Ba
Cletodim	120	99 Aa	99 Aa	99 Aa
Testemunha	--	0,0 C ^{ns}	0,0 C	0,0 B
CV (%)		2,55		

*médias seguidas de mesma letra minúscula (na linha) e de mesma letra maiúscula (na coluna) não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). ^{ns}= não significativo ($p \leq 0,05$).

De maneira similar, o controle do azevém aos 14 DAA foi menor para os herbicidas iodosulfuron-metil e cletodim comparado ao paraquat e/ou glufosinato de amônia, independente do estágio reprodutivo avaliado (Tabela 14). O menor nível de controle evidenciado aos 14 DAA para iodosulfuron-metil e cletodim deve-se possivelmente ao modo de ação mais lento dos herbicidas e a menor mobilidade para plantas mais desenvolvidas comparado a herbicidas de contato onde os sintomas são visíveis num intervalo menor de tempo (CAMPOS et al., 2012). Além disso, não foi constatada diferença significativa de controle entre os estádios reprodutivos de pré-espiga, antese e enchimento de grãos, independente do herbicida testado.

Para as avaliações aos 28 DAA, os níveis de controle do azevém foram superiores a 96% para todos os herbicidas e menor para aplicação de iodosulfuron-metil independente do estágio (Tabela 14). Resultados similares foram reportados para controle de azevém no pré-florescimento onde os níveis foram 13% menores para o herbicida iodosulfuron-metil comparado a aplicação de paraquat aos 28 DAA (PEREIRA; CARVALHO; DAL MAGRO, 2017).

Ao avaliar a produção de sementes cheias produzidas planta⁻¹, a aplicação em estágio de pré-espiga inviabilizou completamente a produção de sementes comparado a testemunha sem aplicação de herbicida (Figura 37).

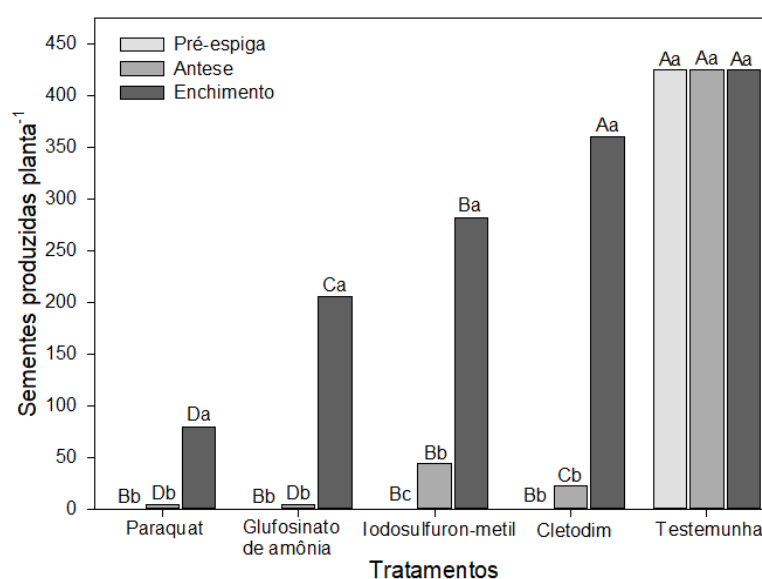


Figura 25- Sementes de azevém produzidas planta⁻¹ após aplicação dos herbicidas paraquat, glufosinato de amônia, iodosulfuron-metil e cletodim para inviabilização de sementes em diferentes estádios reprodutivos. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019. Letras minúsculas comparam o herbicida nos estágios e, letras maiúsculas, comparam os herbicidas para cada estágio através do teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Para os herbicidas aplicados na antese, paraquat e glufosinato de amônia foram os tratamentos herbicidas que proporcionaram redução de 99% na produção de sementes planta⁻¹ comparado a testemunha enquanto que, o uso de iodosulfuron-metil e cletodim, proporcionou redução de 90 e 92%, respectivamente. Todavia, o atraso na aplicação de herbicidas aumentou a produção de sementes cheias planta⁻¹ para todos os tratamentos herbicidas. Ao avaliar o número de sementes produzidas para herbicidas aplicados no enchimento de grãos, houve redução de 81% para o herbicida paraquat e de 51, 36 e 15% para glufosinato de amônia, iodosulfuron-metil e cletodim, respectivamente (Figura 37). De maneira similar, a aplicação tardia de

glifosato reduziu a proporção de sementes de *L. rigidum* Gaudin. (STEADMAN et al., 2005). Em trabalho realizado na Espanha, a redução na produção de sementes de *L. rigidum* Gaudin. com herbicidas proporcionaram redução de 45% no banco de sementes do solo a longo prazo (GONZALEZ-ANDUJAR; FERNANDEZ-QUINTANILLA, 2004). Todavia, a utilização de herbicidas para controle de escapes precisa ser realizada em estágios que impossibilitem a produção de sementes viáveis (PIASECKI et al., 2019).

O teste de germinação das sementes cheias produzidas evidenciou efeito significativo entre os fatores para todas variáveis analisadas, exceto para a percentagem de plântulas anormais onde houve efeito simples para o fator tratamento (Tabela 15, 16 e 17).

Tabela 15- Germinação e sementes mortas de azevém após aplicação de paraquat, glufosinato de amônia, iodosulfuron-metil e cletodim para inviabilização das sementes em diferentes estágios reprodutivos. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019.

Tratamento	Dose (g ia. ha ⁻¹)	Germinação (%)		
		Pré-espiga	Antese	Enchimento
Paraquat	200	0,0 B ^{ns}	0,0 C	0,0 C
Gluf. de amônia	400	0,0 Bb	0,0 Cb	17 Ba
Iodosulfuron-metil	5	0,0 Bb	21 Ba	22 Ba
Cletodim	120	0,0 Ba	1,0 Ca	2,0 Ca
Testemunha	--	89 A ^{ns}	89 A	89 A
CV (%)			11,90	

Tratamento	Dose (g ia. ha ⁻¹)	Sementes mortas (%)		
		Pré-espiga	Antese	Enchimento
Paraquat	200	100 Aa	100 Aa	81 Ab
Gluf. de amônia	400	100 Aa	99 Aa	75 ABb
Iodosulfuron-metil	5	99 Aa	76 Bb	53 Bc
Cletodim	120	100 Aa	98 Aa	57 Bb
Testemunha	--	8,0 B	8,0 C	8,0 C
CV (%)			15,64	

*médias seguida de mesma letra minúscula (na linha) e de mesma letra maiúscula (na coluna) não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). ^{ns}= não significativo ($p \leq 0,05$).

Para germinação foi constatado que todos os herbicidas causaram redução na germinação comparado a testemunha sem aplicação onde 89% das sementes germinaram. Ao avaliar os estágios de aplicação, a germinação foi maior para os herbicidas aplicados no estágio de enchimento de grãos comparado a aplicação realizada na antese ou pré-espiga, onde todos os herbicidas causaram inviabilização da germinação, exceto para iodosulfuron-metil aplicado na antese ou enchimento de

grãos onde aproximadamente 21% das sementes germinaram (Tabela 15). Resultados similares foram reportados em trigo submetido a aplicação dos herbicidas glyphosate e paraquat em estágio de enchimento de grãos onde houve redução significativa da germinação (PERBONI et al., 2018) devido o dano oxidativo causado pelos herbicidas sobre as estruturas de membrana (BELLÉ et al., 2014).

O número de sementes mortas de azevém foi acima de 98% para todos os herbicidas aplicados na pré-espiga e no estágio de antese, exceto para iodosulfuron-metil aplicado na antese onde a inviabilização foi de 76% (Tabela 15). Além disso, o atraso na aplicação dos herbicidas causou redução na percentagem de sementes mortas, especialmente para o herbicida cletodim aplicado no enchimento de grãos onde apenas 57% das sementes foram identificadas como mortas. A aplicação de herbicidas em plantas causa alterações em diversos processos fisiológicos, podendo afetar o enchimento de grãos e a qualidade das sementes, especialmente quando realizadas antes da maturidade fisiológica (JASKULSKI; JASKULSKA, 2014).

Para plântulas anormais não foi evidenciado diferença significativa entre os herbicidas quando comparado com a testemunha sem aplicação (Tabela 16). As plântulas anormais são caracterizadas pela ausência de alguma estrutura essencial da semente que reduz o vigor e a capacidade de desenvolvimento da planta no ambiente (BARTH NETO et al., 2014).

Tabela 16- Plântulas anormais de azevém após aplicação de paraquat, glufosinato de amônia, iodosulfuron-metil e cletodim para inviabilização das sementes em diferentes estágios reprodutivos. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019.

Tratamento	Dose (g ia. ha ⁻¹)	Plântulas anormais (%)
		Estágios reprodutivos
Paraquat	200	0,0 A
Gluf. de amônia	400	0,0 A
Iodosulfuron-metil	5	1,0 A
Cletodim	120	0,0 A
Testemunha	--	1,0 A
CV (%)		8,31

*médias seguidas de mesma letra maiúscula (na coluna) não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

A dessecação de trigo com os herbicidas glufosinato de amônio, cletodim ou paraquat pode causar redução de vigor e no comprimento de plântulas devido a redução da massa das sementes decorrentes da formação incompleta das estruturas essenciais (KRENCHINSKI et al., 2017). Os resultados para a percentagem de sementes dormentes viáveis e não viáveis não evidenciaram

diferença significativa entre os tratamentos herbicidas aplicados na pré-espiga e antese comparado com a testemunha sem aplicação (Tabela 17). Todavia, o maior percentual de sementes dormentes viáveis foi encontrado para a aplicação de iodosulfuron-metil no enchimento de grãos com 5%. Elevados níveis de dormência em sementes de plantas daninhas permitem maior longevidade no banco de sementes do solo e germinação escalonada no tempo, especialmente quando as condições ambientais são desfavoráveis (BENECH-ARNOLD et al., 2000).

Tabela 17- Sementes viáveis e não-viáveis de azevém após aplicação de paraquat, glufosinato de amônia, iodosulfuron-metil e cletodim para inviabilização das sementes em diferentes estádios reprodutivos. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2019.

Tratamento	Dose (g ia. ha ⁻¹)	Sementes viáveis (%)		
		Pré-espiga	Antese	Enchimento
Paraquat	200	0,0 Aa	0,0 Aa	2,0 Ba
Gluf. de amônia	400	0,0 Aa	0,0 Aa	1,0 Ba
Iodosulfuron-metil	5	0,0 Ab	1,0 Ab	5,0 Aa
Cletodim	120	0,0 Aa	0,0 Aa	2,0 Ba
Testemunha	--	1,0 A ^{ns}	1,0 A	1,0 B
CV (%)		10,81		
Tratamento	Dose (g ia. ha ⁻¹)	Sementes não viáveis (%)		
		Pré-espiga	Antese	Enchimento
Paraquat	200	0,0 Ab	0,0 Ab	16 Ba
Gluf. de amônia	400	0,0 Ab	1,0 Ab	7,0 Ca
Iodosulfuron-metil	5	0,0 Ab	1,0 Ab	19 Ba
Cletodim	120	0,0 Ab	1,0 Ab	39 Aa
Testemunha	--	1,0 A ^{ns}	1,0 A	1,0 D
CV (%)		8,31		

*médias seguidas de mesma letra minúscula (na linha) e de mesma letra maiúscula (na coluna) não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). ^{ns}= não significativo ($p \leq 0,05$).

Para as sementes dormentes não viáveis, os maiores percentuais foram evidenciados para aplicação de cletodim com 39%, seguido de iodosulfuron-metil e paraquat com valores acima de 16% no estágio de enchimento de grãos (Tabela 17). Para sementes com reservas limitadas, os processos de deterioração decorrentes do ataque de microrganismos e/ou estresses ambientais como temperatura e umidade são considerados as principais causas para aumento na percentagem de sementes dormentes não viáveis (VIVIAN et al., 2008; AGOSTINETTO et al., 2018). Todavia, ao avaliar detalhadamente as sementes dormentes não-viáveis em microscópio, foi constatado que mais de 90% das

sementes analisadas do não apresentavam embrião, independente do herbicida aplicado durante o enchimento de grãos (Figura 38).



Figura 26- Efeito dos herbicidas sobre as sementes dormentes não viáveis de azevém após aplicação em estágio de enchimento de grãos. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019.

As práticas de manejo preconizadas para azevém são consideradas de suma importância para redução do banco de sementes do solo devido a diminuição das entradas e, consideradas opções para manejo de azevém resistentes a herbicidas. A avaliação de cada cenário com o levantamento prévio dos níveis de infestação e a adoção de estratégias de manejo conjuntas devem ser consideradas para proporcionar redução da interferência e de futuras infestações de azevém resistente.

4.4 Conclusões

A viabilidade do azevém no banco de sementes do solo é inferior a dois anos e aumenta com a profundidade de enterrio.

A quantificação hormonal da dormência do azevém é regulada pelo aumento na concentração de AIA e ocorre em intervalo superior a 56 dias após coleta da planta-mãe. Entretanto, nenhum dos promotores da germinação, independente da concentração, causa aumento na percentagem de germinação do azevém devido ao elevado nível de dormência primária.

O centeio, ervilhaca e aveia-preta apresentam elevada capacidade de supressão do azevém e auxiliam na redução do banco de sementes do solo comparado ao pousio, canola e trigo.

O herbicida piroxasulfone apresenta controle altamente satisfatório do azevém resistente e alta seletividade na cultura do trigo sem reduzir a produtividade da cultura comparado aos demais tratamentos herbicidas.

A utilização de milho em sucessão proporciona redução do banco de sementes e da população infestante, independente do manejo realizado na pré-semeadura.

Os herbicidas paraquat e glufosinato de amônia causam completa inviabilização das sementes de azevém para aplicações realizadas em estágio fenológico de pré-espiga ou antese.

5. Capítulo IV – Adaptabilidade e habilidade competitiva de *Lolium multiflorum* Lam. tetraploide e diploide para manejo da resistência.

5.1 Introdução

O azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) é uma planta monocotiledônea de fecundação cruzada amplamente adaptada a diversas condições ambientais e, facilmente encontrada em áreas de pastagem destinadas para a alimentação animal ou em campos cultivados com cereais de inverno onde pode ocasionar redução da produtividade (VARGAS; ROMAN, 2005). A adoção do controle químico para manejo de azevém visa proteger o potencial produtivo das culturas, reduzindo a interferência, aliando alta eficácia e baixo custo em relação a outros métodos de controle (BUSI et al., 2013).

No campo, a grande variabilidade genética das plantas daninhas associada aos efeitos do ambiente e das práticas de manejo inadequadas, como o uso repetitivo de moléculas herbicidas com o mesmo local alvo, exercem elevada pressão de seleção e favoreceram o surgimento, adaptação e sobrevivência de biótipos resistentes (POWLES; YU, 2010; GOULD; BROWN; KUZMA, 2018). A resistência de plantas daninhas é resultado da adaptação evolutiva de alguns indivíduos que pode ocorrer em uma ou mais etapas da ação do herbicida, incluindo desde sua absorção até o dano celular que podem causar (DÉYLE; JASIENIUK; LE CORRE, 2013). Para plantas de azevém diploide resistente ao glifosato, os principais mecanismos de resistência reportados incluem a redução da absorção e translocação da molécula, rápido sequestro para o vacúolo, mutações no local alvo ou superexpressão da EPSPs (SALAS et al., 2012; SAMMONS; GAINES, 2014).

O surgimento da resistência de plantas daninhas a herbicidas requer a adoção de estratégias para prevenção e/ou redução da evolução da resistência.

Dentro deste contexto, o uso de espécies alternativas de inverno como o azevém tetraploide em campos do Rio Grande do Sul têm aumentado como uma estratégia de manejo ao azevém diploide resistente a herbicidas (OLIVEIRA et al., 2014). O uso crescente do azevém tetraploide deve-se a maior produção de massa seca, ciclo vegetativo mais longo e melhor qualidade forrageira quando comparado ao azevém diploide (NAIR, 2004; GILLILAND; JOHNSTON; CONNOLLY, 2007). Todavia, o nível de ploidia do azevém ($2n=2x= 14$ cromossomos para diploide e $2n=4x= 28$ cromossomos para o tetraploide) determinam diferentes características genóticas e fenóticas, além de afetar diretamente no desempenho da planta devido ao aumento no volume celular (BALOCCHI; LÓPEZ, 2009).

Os estudos de adaptabilidade ou valor adaptativo (“*fitness*”) constituem ferramentas importantes para entendimento dos componentes de crescimento, sobrevivência e produção de sementes viáveis em função do aproveitamento dos recursos de crescimento em determinado nicho ecológico (RADOSEVICH; HOLT; GHERSA, 2007). As principais alterações do valor adaptativo são a redução na taxa de crescimento, atividade fotossintética diferenciada, reduzida capacidade de competir por recursos e menor produção de sementes por planta (VILA-AIUB et al., 2015). Entretanto, o custo adaptativo refere-se a expressão fenotípica final resultante da interação genética das plantas, da base molecular de resistência (mecanismo de resistência/gene/alelo; interações alélicas e número de alelos de resistência) e do ambiente biótico e abiótico, podendo acarretar mudanças morfofisiológicas (VILA-AIUB; GUNDEL; PRESTON, 2015).

As modificações nas características fisiológicas e na taxa de crescimento das plantas podem alterar a competitividade dos indivíduos e sua dinâmica dentro da população, afetando diretamente as estratégias de manejo e prevenção da evolução da resistência (CHRISTOFFOLETI, 2001; LI et al., 2013). Estudos reportaram que o comportamento ecofisiológico de plantas resistentes a herbicidas inibidores da EPSPs foi similar comparado a indivíduos suscetíveis (VARGAS et al., 2005; FERREIRA et al., 2008; BRAVO et al., 2017), demonstrando a elevada capacidade de adaptação a mudanças ambientais através da alocação de recursos (VILA-AIUB et al., 2009).

Em sistemas agrícolas, a capacidade de adaptação e a presença de plantas daninhas em áreas de cultivo estão relacionadas com sua presença no banco de sementes e com a capacidade de liberação da dormência, podendo interferir em

maior grau dependendo do momento em que emergirem (BATLLA; BENECH-ARNOLD, 2007). A maior habilidade competitiva de plantas daninhas têm sido alvo de estudo através dos principais componentes do ciclo de vida, especialmente relacionados a fecundidade e germinação de sementes, considerados os principais fatores que favorecem a prevalência de um indivíduo no ambiente (KESHTKAR et al., 2019).

A capacidade competitiva entre dois ou mais indivíduos pode ser determinada através dos atributos fisiológicos e morfológicos em função da exploração dos recursos disponíveis em determinado nicho ecológico (SWANTON; NKOA; BLACKSHAW, 2015). A série de substituição é considerada uma valiosa ferramenta para fornecer informações sobre as interações entre as espécies, podem ser categorizadas como negativas, positivas ou neutras através dos coeficientes de competição e agrupamento relativo (WANG et al., 2006). Além disso, estudos sobre competitividade de culturas com plantas daninhas permitem desenvolver estratégias de manejo cultural onde espécies que apresentam maior acúmulo de matéria seca da parte aérea possuem maior habilidade competitiva (FLECK et al., 2003).

Em cevada e trigo, a habilidade competitiva do azevém foi maior que as culturas onde afetou o afilhamento, a área foliar e a massa da matéria seca da parte aérea de plantas resultando em menor produtividade final (RIGOLI et al., 2008; GALON et al., 2011). Todavia, a sustentabilidade dos sistemas de produção depende da diversificação das práticas de manejo para controle eficiente das plantas daninhas (SHANER; BECKIE, 2014), podendo auxiliar na reversão da resistência através dos custos adaptativos negativos com dominância de indivíduos suscetíveis sobre uma população resistente (KESHTKAR et al., 2019). Os objetivos foram avaliar o ciclo de vida, comparar o valor adaptativo e a habilidade competitiva do azevém diploide e tetraploide para manejo da resistência.

5.2 Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação pertencentes ao CEHERB/FAEM/UFPel durante o ano de 2016 e 2017. As sementes de azevém diploide cultivar BRS Ponteio e do tetraploide cultivar INIA Winter Star foram usadas para avaliar o ciclo de vida, adaptabilidade e habilidade competitiva. As plantas foram alocadas em vasos plásticos contendo solo classificado como Argissolo

Vermelho-Amarelo pertencente a Unidade Mapeamento Pelotas como Argissolo Vermelho-Amarelo. A análise do solo evidenciou pH em água= 5,6; CTC_{pH7}= 7,2 cmol_c dm⁻³; matéria orgânica= 1,5%; argila= 16%; textura = 4; Ca= 4,1 cmol_c dm⁻³; Mg= 1,1 cmol_c dm⁻³; Al= 1,8 cmol_c dm⁻³; P= 6,5 mg dm⁻³ e K= 0,15 cmol_c dm⁻³. A correção da fertilidade foi realizada conforme as recomendações para as forrageiras de inverno (SBCS, 2016). A apresentação dos materiais e métodos específicos de cada experimento estão descritos abaixo.

5.2.1 Ciclo e duração dos principais estágios fenológicos de *Lolium multiflorum* Lam. diploide e tetraploide.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições. As sementes não dormentes foram semeadas em vasos plásticos com capacidade volumétrica de 10dm³, preenchidos com solo. Após a emergência, foi mantida apenas uma planta em cada unidade experimental para a realização das avaliações.

Os principais estágios avaliados foram emergência das sementes, emergência de coleótilo, primeira folha verdadeira, afilhamento, alongamento do caule, emissão da espiga, florescimento pleno, enchimento da semente, maturação e maturação de sementes (início de dormência) usando a escala fenológica para cereais adaptada de Bleiholder (BLEIHOLDER et al., 1997). Para cálculo da duração de cada estágio, foi considerado a presença de 50% das plantas com as mesmas características fenotípicas.

5.2.2 Valor adaptativo de *Lolium multiflorum* Lam. diploide e tetraploide para manejo da resistência.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco repetições. Cada unidade experimental foi composta de uma planta por vaso plástico com capacidade de 8dm³ cada, preenchidos com solo e substrato GerminaPlant[®] na proporção 2:1. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial onde o fator A compreendeu o azevém diploide (cultivar BRS Ponteio) e tetraploide (cultivar INIA Winter Star) e, o fator B, foi composto por dez

épocas de avaliação (zero, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 140 e 170 dias após a emergência).

As variáveis avaliadas, em cada época, foram: estatura, número de afilhos (NA), área foliar (AF), massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) e massa seca de raiz (MSR). A estatura foi determinada com o auxílio de régua milimetrada tomando-se o comprimento da planta desde o nível do solo até o ápice com o limbo foliar estendido. A AF foi determinada com o auxílio do medidor de área foliar (modelo LI 3100C) e, a MMSPA, foi obtida após secagem do material em estufa com circulação de ar à temperatura de 60°C por 72h, seguido de pesagem em balança analítica. Ao final do ciclo, foi avaliado o número de espigas e espiguetas produzidas bem como foi realizado o peso de mil sementes e a contagem das sementes produzidas planta⁻¹.

Os resultados de AF e MMSPA foram utilizados para determinar a taxa de crescimento absoluto (TCA) e a razão de área foliar (RAF). A TCA, expressa em g planta⁻¹dia⁻¹, demonstra a velocidade média de crescimento das plantas ao longo do período observado (REIS; MULLER, 1978), obtida pela fórmula:

$$TCA = (W_2 - W_1) / (t_2 - t_1)$$

onde: W_2 e W_1 são as MMSPA de duas amostragens sucessivas, t_2 e t_1 são os dias transcorridos entre as duas observações.

A RAF (cm² g⁻¹) serve como parâmetro apropriado para as avaliações de efeitos genotípicos, climáticos e do manejo de comunidades vegetais onde considera a área foliar útil para a fotossíntese e a massa seca total (WEST; BRIGGS; KIDD, 1920), obtida pela fórmula:

$$RAF = AF / MST$$

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade (teste de Shapiro Wilk) e, posteriormente, submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Caso constatada significância estatística, realizou-se análise de regressão para o fator épocas de avaliação utilizando o SigmaPlot 12.0 (SIGMAPLOT, 2012) e, para o fator biótipo, foi procedida a comparação entre as médias utilizando o teste F ($p \leq 0,05$) para as variáveis número de espigas por planta e espiguetas produzidas por espiga bem como foi realizado o peso de mil sementes e a contagem das sementes produzidas planta⁻¹.

Para todas as variáveis mensuradas, exceto para RAF, os dados ajustaram-se a equação de regressão sigmoidal com três parâmetros conforme segue:

$$y = a / (1 + \exp^{-(x - x_0/b)})$$

onde: y = variável resposta de interesse; \exp = função exponencial; x = dias após a emergência e; os valores de a , b e x_0 são os parâmetros da regressão não linear do modelo com a = diferença entre a assíntota máxima e mínima; b = declive da curva, x_0 = dias após a semeadura correspondente a 50% do rendimento da variável dependente para o valor da assíntota máxima (a).

Para a variável RAF, os dados se ajustaram a equação de regressão do tipo peak Gaussian com três parâmetros

$$y = a * \exp^{-0,5 (x - x_0/b)^2}$$

onde: y = variável resposta de interesse; \exp = função exponencial; x = dias após a emergência e; os valores de a , b e x_0 são os parâmetros da regressão não linear do modelo com a = diferença entre a assíntota máxima e mínima; b = declive da curva, x_0 = dias após a semeadura correspondente a 50% do rendimento da variável dependente para o valor da assíntota máxima (a).

5.2.3 Habilidade competitiva de *Lolium multiflorum* Lam. diploide e tetraploide em sistemas agrícolas.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco repetições. As plantas foram alocadas em unidades experimentais composta por vasos plásticos com capacidade volumétrica de 4dm³, preenchidos com solo.

Primeiramente, foi realizado um experimento para determinar a população de plantas a partir da qual a área foliar (AF) e a massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) por unidade de área tornam-se constantes, independente da população, baseado na “lei de produção final constante” (RADOSEVICH; HOLT; GHERSA, 2007). Este experimento foi conduzido em série aditiva utilizando monocultivo de azevém diploide e tetraploide nas populações de uma, 2, 4, 8, 16, 32 e 64 plantas vaso⁻¹, equivalente a 12, 22, 44, 88, 176, 352 e 704 plantas m⁻². As variáveis analisadas foram área foliar (cm² planta⁻¹) e MMSPA (g planta⁻¹) aos 50 dias após a emergência (DAE). A AF foi determinada com auxílio de determinador de AF e a

MMSPA foi quantificada pela pesagem do material vegetal após secagem em estufa a 60°C por 72hs.

A habilidade competitiva entre o azevém diploide e tetraploide foi avaliada por dois anos consecutivos através de experimentos em série de substituição, utilizando a população de plantas determinada no ensaio anterior. Em cada série, as proporções testadas entre plantas de azevém diploide e tetraploide foram de 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 e 0:100.

As variáveis avaliadas foram área foliar, número de afilhos (NA), estatura de planta (EST) e massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) aos 50 DAE, com os valores médios expressos em unidades por planta. A área foliar foi determinada com o auxílio do medidor de área foliar (modelo LI 3100C) e, a estatura das plantas, foi obtida com auxílio de régua milimetrada. A MMSPA foi obtida após secagem em estufa com circulação de ar a temperatura de 60°C por 72 hs.

Com base nos resultados obtidos das variáveis, foi calculada a produtividade relativa (PR) das misturas em relação ao monocultivo. A produtividade relativa total (PRT) foi obtida pela soma das PR do azevém diploide e tetraploide de cada experimento. Os índices de competitividade relativa (CR), coeficiente de agrupamento relativo (K) e competitividade (C) foram calculados na proporção de 50% dos competidores. A CR representa o crescimento comparativo do azevém diploide em relação ao tetraploide; K indica a dominância relativa de uma espécie sobre a outra e, C indica a espécie mais competitiva. Os índices CR, K e C para serem considerados diferentes, necessitam da ocorrência de, no mínimo, duas proporções com significância estatística através do teste t (BIANCHI; FLECK; LAMEGO, 2006).

Para a análise estatística da PR, primeiro foi calculada a diferença para os valores de PR obtidos nas proporções de 25, 50 e 75% de plantas em relação aos valores pertencentes às retas hipotéticas obtidas nas respectivas proporções (PASSINI; CHRISTOFFOLETI; YADA, 2003). O teste t ($p \leq 0,05$) foi utilizado para testar as diferenças entre os índices estimados em relação a reta hipotética.

Os resultados obtidos para AF, NA, EST e MMSPA foram submetidos à análise de variância. Ocorrendo significância pelo teste F ($p \leq 0,05$), as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$), considerando suas respectivas monoculturas como testemunhas.

5.3 Resultados e discussão

A apresentação dos resultados e discussão de cada experimento estão descritos abaixo, seguindo a sequência descrita nos materiais e métodos.

5.3.1 Ciclo e duração dos principais estágios fenológicos de *Lolium multiflorum* Lam. diploide e tetraploide.

O estabelecimento do azevém em áreas do Sul do Brasil inicia com germinação da semente não-dormente após exposição a condições ideais, especialmente sob temperaturas abaixo de 15°C que ocorrem durante os meses de março a junho (Figura 39).

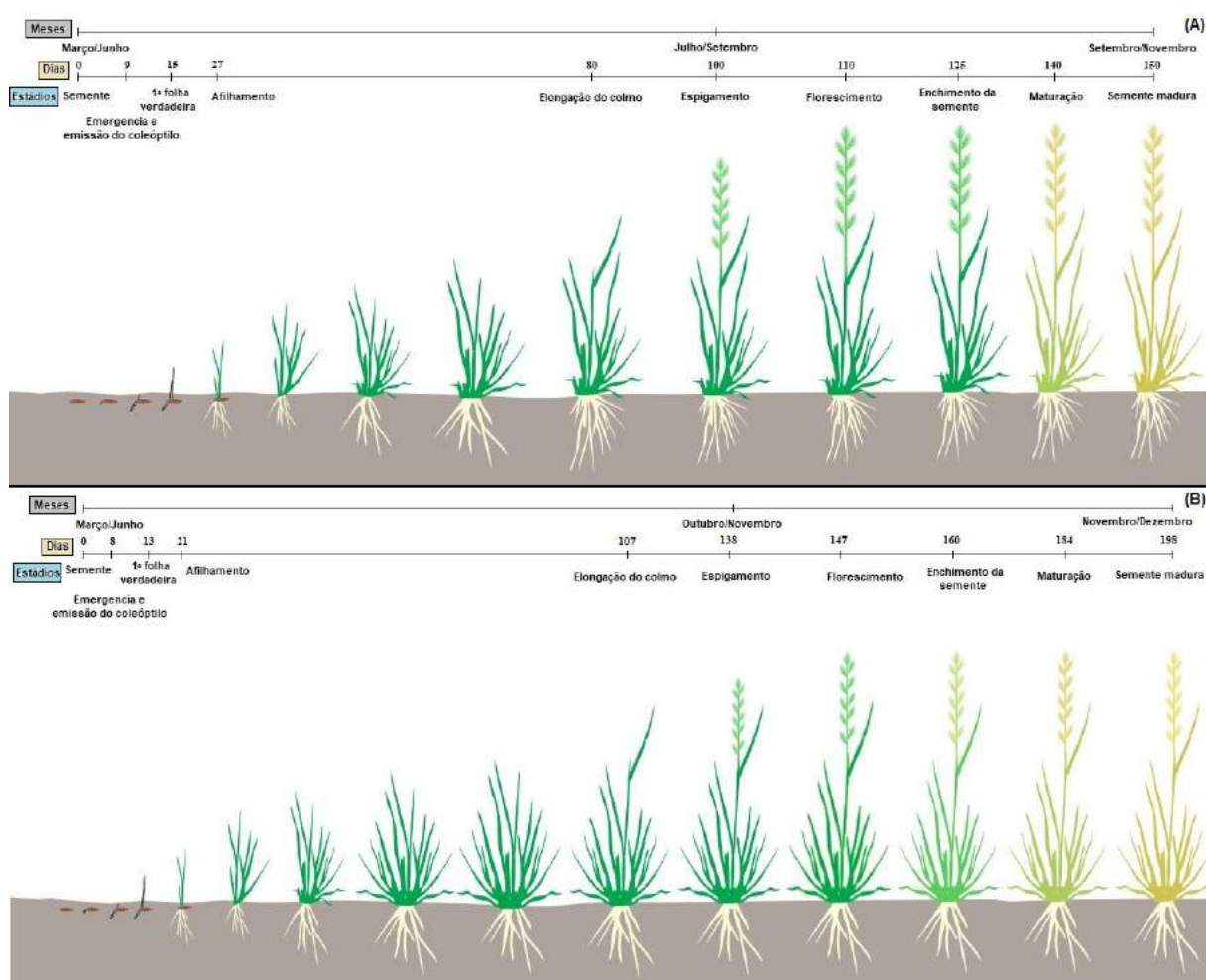


Figura 27- Ciclo de vida e principais estágios fenológicos de desenvolvimento do azevém diploide BRS Ponteio (A) e tetraploide Winter Star (B) com a duração (dias após semeadura) e meses de ocorrência no campo. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019.

Após a semeadura da semente seca e/ou daquelas presentes no banco de sementes do solo, o processo germinativo inicia com a protusão da radícula e emergência em período que variou de oito a nove dias para o azevém tetraploide e diploide, respectivamente, seguido da extrusão do coleóptilo sob a superfície do solo em processos dependentes de temperatura, umidade e profundidade de enterrio da semente.

Para a germinação em diferentes profundidades com temperatura e umidade controlada, as sementes de azevém não dormentes presentes na camada do solo até 2,5cm possuem maior velocidade de emergência comparado aquelas enterradas a 5cm onde a germinação é mais lenta. A velocidade de emergência juntamente com o rápido crescimento inicial são os principais componentes que proporcionam maior potencial competitivo de uma planta sobre outra em determinada área (SWANTON; NKOA; BLACKSHAW, 2015).

A principal diferença de ciclo de vida evidenciado entre os genótipos refere-se ao maior período compreendido entre o afilhamento e alongação com 53 e 86 dias para o azevém diploide e tetraploide, respectivamente (Figura 39). O início do afilhamento ocorreu 6 dias antes para o azevém tetraploide comparado ao diploide e foi 33 dias mais longo, em período caracterizado pelo significativo da massa seca, estatura de plantas bem como no número de afilhos. O aumento do período vegetativo do azevém tetraploide é resultado do melhoramento genético visando maior número de cortes para pastejo animal (TONETTO et al., 2011). Outro ponto importante referente ao maior ciclo, refere-se a competição e eficiência de utilização dos recursos disponíveis do ambiente onde os efeitos da competição tendem a resultar em menores perdas de produtividade (BALBINOT JR. et al., 2003).

A avaliação do ciclo de vida do azevém diploide demonstrou que a maturação das sementes e realimentação dos bancos de semente ocorreu aos 150 dias após semeadura, englobando os meses de setembro a novembro antes da semeadura da soja (Figura 39). Para o azevém tetraploide, o ciclo de vida completo ocorreu 198 dias após a semeadura com liberação das sementes ao solo nos meses de novembro a dezembro. Em sistemas agrícolas, o ciclo de vida dos genótipos pode oferecer uma oportunidade para manejo ao azevém diploide resistente a herbicidas, contribuindo para a reversão da resistência. De maneira similar, reduções na realimentação dos bancos de sementes do solo são considerados o principal alvo de manejo para reduzir futuras infestações de plantas daninhas (NORRIS, 2007). Na

região do Sul do Brasil, a dessecação do azevém com herbicidas ocorre geralmente 20 dias antes da semeadura da soja (mês de outubro), período onde a maior parte das sementes de azevém já está madura, contribuindo significativamente para aumento do banco de sementes do solo. Com base no ciclo de vida, a antecipação da dessecação em sistemas de cultivo pode contribuir para reduzir a realimentação do banco de sementes do solo, auxiliando no manejo da resistência (GALVAN et al., 2015; JHA et al., 2017). Além disso, o uso do azevém tetraploide como uma estratégia de manejo ao azevém diploide resistente ao glifosato ou como planta forrageira de inverno, requer planejamento adequado para não comprometer o estabelecimento das culturas de sucessão de verão bem como aprofundamento quanto ao seu comportamento e capacidade competitiva em sistemas agrícolas do Sul do Brasil.

5.3.2 Valor adaptativo de *Lolium multiflorum* Lam. diploide e tetraploide para manejo da resistência.

O teste de Shapiro Wilk não evidenciou a necessidade de transformação dos dados para o experimento de valor adaptativo com efeito significativo entre os genótipos e tempos de coleta avaliados para todas as variáveis mensuradas e, ajuste satisfatório dos dados ao modelo de equação não linear do tipo sigmoidal e peak Gaussian (Figura 40, 41, 42 e 43).

Para estatura de plantas, os resultados demonstraram rápido crescimento inicial para o azevém tetraploide comparado ao diploide, onde os valores foram até 50% superiores nas avaliações realizadas entre 15 e 45 dias após a emergência (Figura 40A). Com ciclo de vida menor, maior estatura do azevém diploide foi evidenciado para o período compreendido entre 75 e 120 dias após a emergência devido a alongação do colmo. Todavia, a estatura final das plantas de azevém diploide e tetraploide foi similar aos 150 dias após emergência com valores próximos a 113cm (Figura 40A). Os resultados para azevém tetraploide evidenciaram produção 50% superior no número de afilhos comparado ao diploide, com incrementos significativos para as avaliações realizadas entre 45 e 75 dias após emergência em ambos os genótipos (Figura 40B).

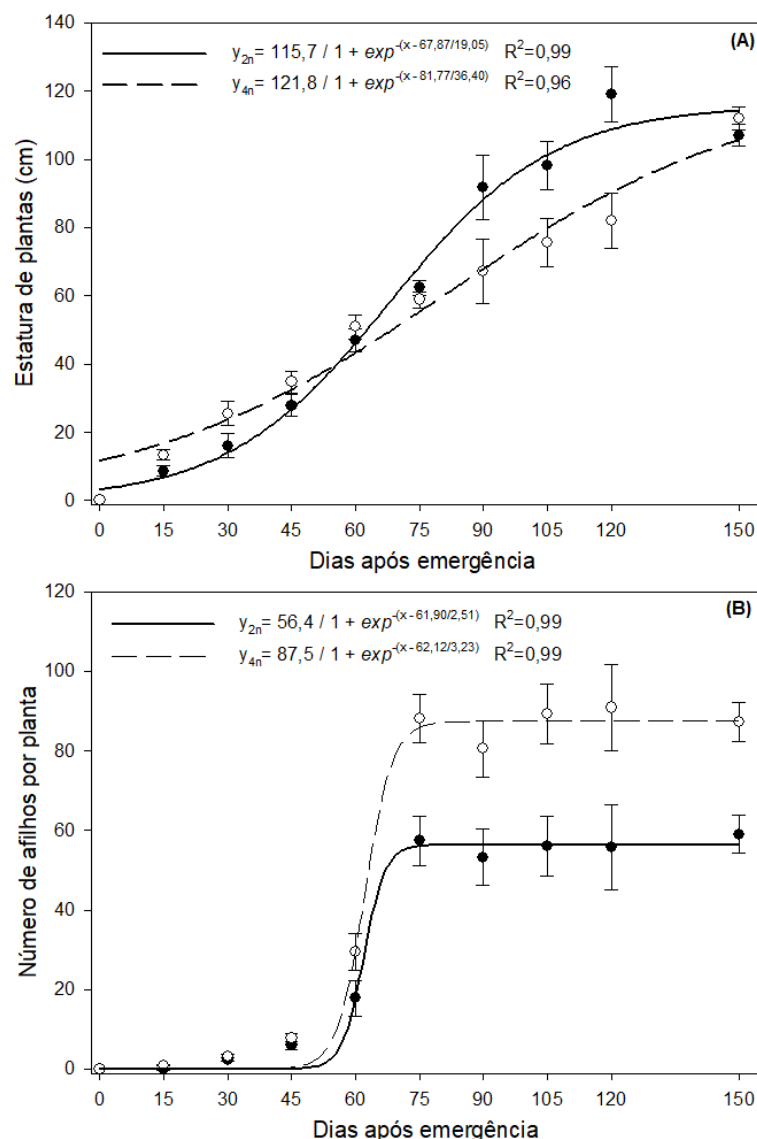


Figura 28- Estatura de plantas (A) e número de aflhos (B) em genótipos de azevém avaliado até 150 dias após a emergência. FAEM/UFPEL, Capão do Leão/RS, 2019. Os pontos representam os valores médios das repetições e, as barras, representam a diferença mínima significativa para cada tempo avaliado ($p < 0,05$).

O rápido desenvolvimento inicial de plantas aliado a maior estatura e capacidade de afilhamento são características importantes para a competição, especialmente na busca por radiação solar (FLECK et al., 2007; RIGOLI et al., 2009). Mudanças na qualidade da luz devido a ocorrência de plantas vizinhas são detectadas pelos fotorreceptores da fitocromo e podem causar alterações fisiológicas e respostas diferenciais nos níveis de expressão gênica em resposta ao escape ao sombreamento, afetando a capacidade competitiva (LE et al., 2012; MCKENZIE-GOPSILL et al., 2016). Além disso, a luz exerce papel relevante na ocupação de espaço e no número de aflhos para espécies gramíneas (GALON et

al., 2011) onde há uma relação inversa entre tamanho e número de afilhos (CALINA et al., 2012). Resultados similares foram reportados para cevada em competição com azevém onde plantas com maior número de afilhos apresentaram vantagens na ocupação do espaço e na supressão no crescimento de plantas vizinhas (TIRONI et al., 2014).

Os resultados demonstraram acúmulo superior a 60% na área foliar do azevém tetraploide comparado ao diploide entre 90 e 150 dias após a emergência (Figura 41A). Em todo o período avaliado, a AF do azevém tetraploide foi superior ao diploide com aumento linear em ambos os genótipos entre as avaliações realizadas entre 45 e 90 dias após a emergência.

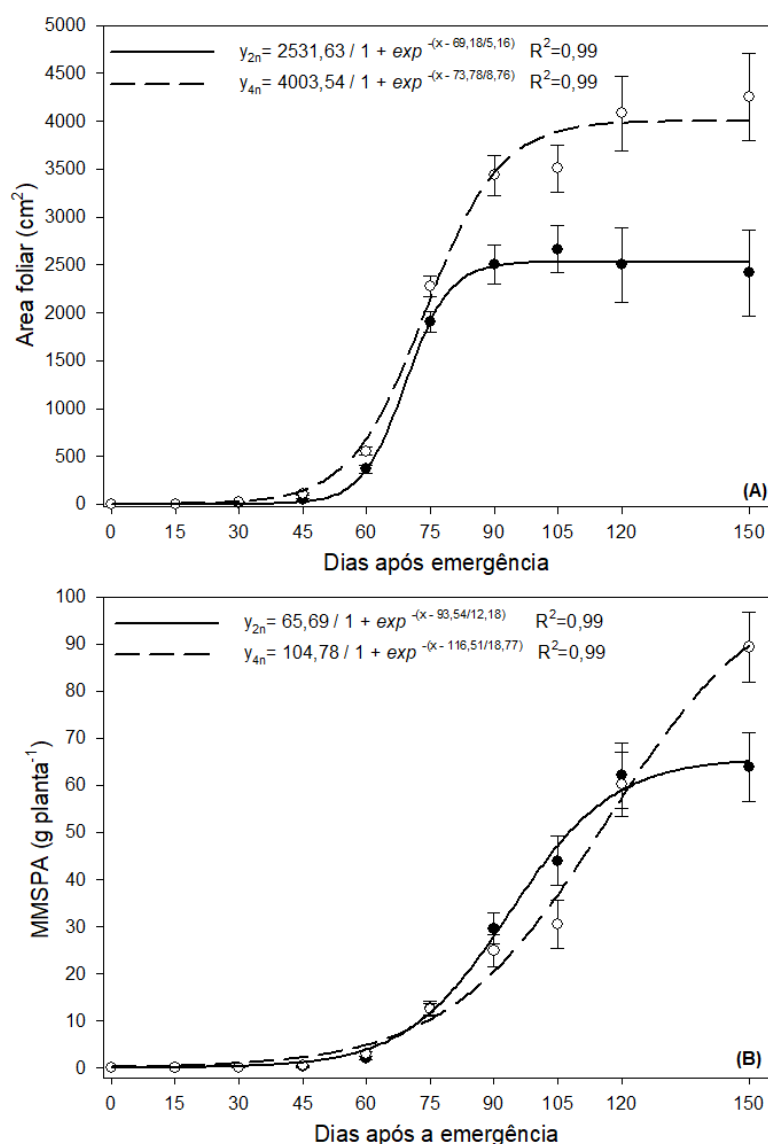


Figura 29- Área foliar (A) e MMSPA (B) em genótipos de azevém avaliado até 150 dias após a emergência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019. Os pontos representam os valores médios das repetições e, as barras, representam a diferença mínima significativa para cada tempo avaliado ($p < 0,05$).

Os valores de AF são diretamente relacionados com a interceptação de luz e capacidade fotossintética das plantas, demonstrando que a maior fixação de CO₂ proporcionando vantagens competitivas em ambientes agrícolas (FRAGA et al., 2013). O ciclo mais longo e a presença de folhas mais longas e largas do azevém tetraploide são características que favorecem a interceptação de luz e, proporcionam aumento da AF e maior acúmulo de fotoassimilados (O'DONOVAN; DELABY, 2005). Todavia, os resultados obtidos demonstraram que a MMSPA dos genótipos foi similar ao longo do ciclo, sendo maior para o azevém tetraploide apenas aos 150 dias após a emergência, valores 60% superiores ao genótipo diploide (Figura 41B). Resultados reportaram que o acúmulo de MMSPA é dependente da relação colmo:folha onde o conteúdo de água exerce grande influência sobre este parâmetro (TONETTO et al., 2011). Para Benincasa (2003), o acúmulo de MMSPA é dependente do desempenho do sistema assimilatório proveniente da atividade fotossintética.

Para azevém tetraploide, maior acúmulo de MMSPA foi obtido através do melhoramento genético e aumento da fase vegetativa, permitindo aumentar a produção de forragem e o número de cortes para pastejo comparado ao azevém diploide (OLIVEIRA et al., 2014). Plantas que produzem maiores quantidades de matéria seca num curto espaço de tempo são mais competitivas, pois podem suprimir o crescimento de plantas vizinhas devido a redução dos recursos do meio que, geralmente, são limitados (FLECK et al., 2006; RADOSEVICH; HOLT; GHERSA, 2007).

O acúmulo de massa seca de raiz dos genótipos foi similar até 75 dias após a emergência, diferindo significativamente nos demais períodos avaliados onde o azevém tetraploide demonstrou acúmulo superior a 260% comparado ao diploide aos 150 dias após a emergência (Figura 42A). O maior desenvolvimento radicular evidenciado para plantas de azevém tetraploide contribuem no uso eficiente da água e assimilação de nutrientes limitados no ambiente bem como auxiliar na redução da erosão e melhoraria das características biológicas do solo (DERU et al., 2014). Para a MST, os resultados evidenciaram comportamento similar até 105 dias após a emergência e, acúmulo superior a 71% para o azevém tetraploide aos 150 dias após emergência (Figura 42B).

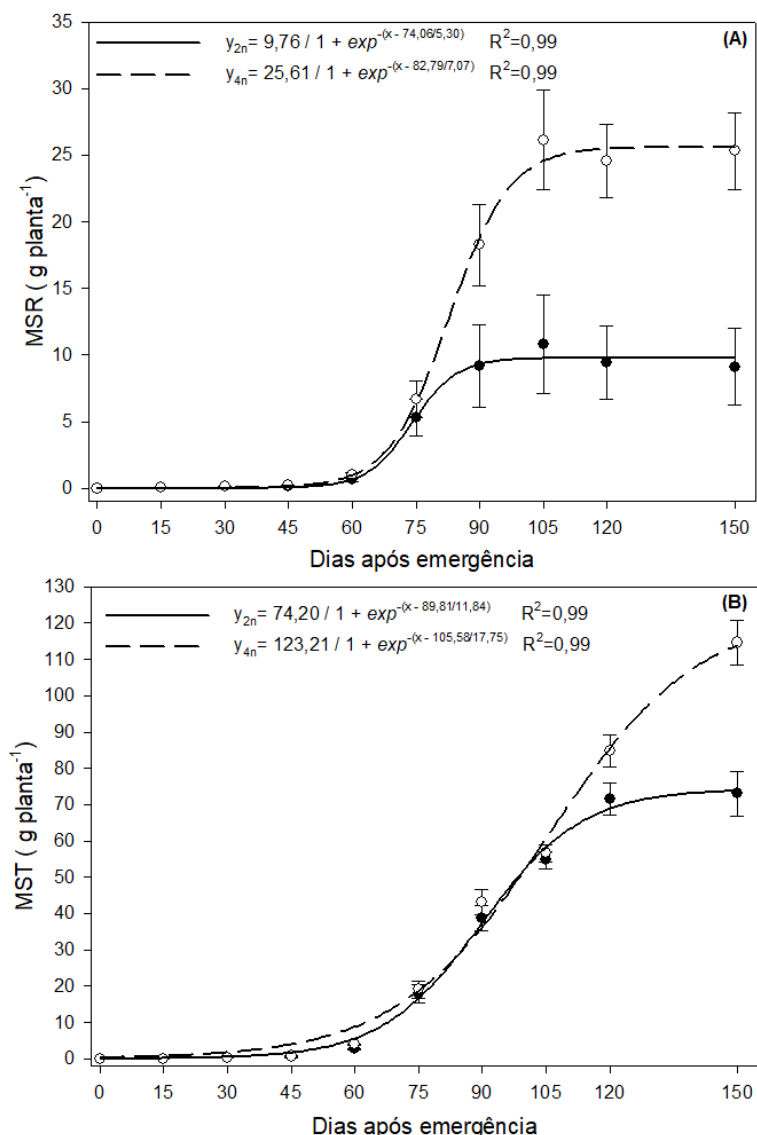


Figura 30- Massa seca de raízes (A) e massa seca total (B) em genótipos de azevém avaliado até 150 dias após a emergência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019. Os pontos representam os valores médios das repetições e, as barras, representam a diferença mínima significativa para cada tempo avaliado ($p < 0,05$).

A avaliação do acúmulo de MST é uma importante variável para estudar competição pois considera o somatório da MMSPA e da MSR com base nas relações de atividade fotossintética e capacidade de explorar os recursos disponíveis no solo (VARGAS et al., 2005b). Todavia, não há evidências de custos de adaptabilidade para a variável MSR em populações resistentes a herbicidas comparados a plantas suscetíveis (DARMENCY, 2013). Além disso, a capacidade de utilização do recursos limitados do ambiente tornando-os indisponíveis para plantas vizinhas é característica que exerce grande influência sobre a competição (RADOSEVICH; HOLT; GHERSA, 2007).

Para a variável TCA, foi observado que os genótipos apresentaram comportamento similar até 120 dias após emergência, com diferença superior a 80% para o azevém tetraploide na avaliação final do estudo (Figura 43A).

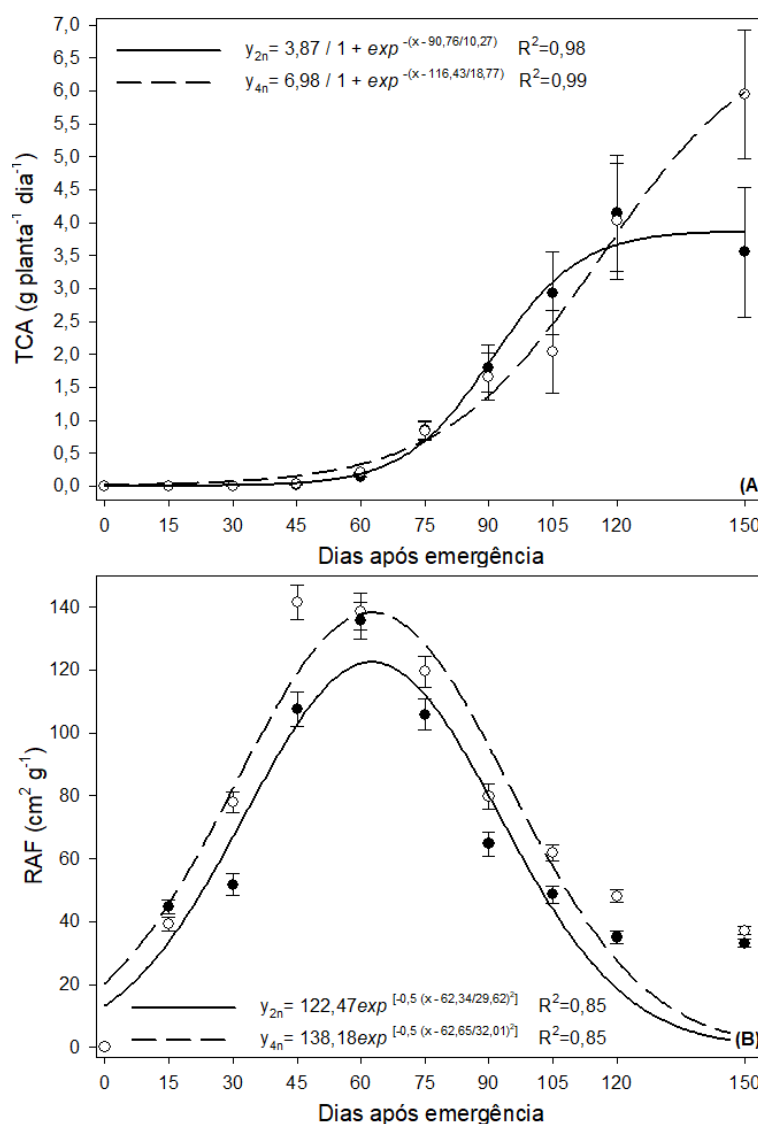


Figura 31- Taxa de crescimento absoluto (A) e razão de área foliar (B) em genótipos de azevém avaliado até 150 dias após a emergência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019. Os pontos representam os valores médios das repetições e, as barras, representam a diferença mínima significativa para cada tempo avaliado ($p < 0,05$).

A TCA indica a velocidade de crescimento em função do tempo onde os valores são proporcionais a AF e o índice de área foliar (ALVAREZ; CRUSCIOL; NASCENTE, 2012). Todavia, a ausência de diferenças na TCA indica que a produtividade e capacidade competitiva entre plantas é semelhante (VIDAL; TREZZI, 2000) enquanto que, maior TCA pode representar vantagem ecológica na ocupação do espaço (RADOSEVICH; HOLT; GHERSA, 2007). Cabe ressaltar ainda que, as

respostas de crescimento dos genótipos de azevém tetraploide podem ser distintas, especialmente para invernos mais rigorosos onde o crescimento é menor devido a temperatura basal mais elevada comparado a genótipos diploides (MULLER et al., 2009).

Os resultados obtidos para a variável RAF demonstraram a ocorrência de diferença significativa entre os genótipos em todas as épocas avaliadas, sendo superior para o azevém tetraploide em aproximadamente 30% (Figura 43B). A RAF evidencia a translocação e partição de assimilados para as folhas em relação ao total de matéria seca produzida pela planta (SCOTT; BATCHELOR, 1979). O decréscimo observado a partir dos 60 dias após emergência, ocorreu devido a interferência exercida pelas folhas superiores sobre as inferiores e partição diferencial entre as estruturas vegetativas e reprodutivas, considerados drenos competitivos (BRIGHENTI et al., 1993; BENINCASA, 2003). Além disso, maior RAF representa maior potencial competitivo devido a capacidade da planta interceptar energia luminosa e sombrear plantas vizinhas (FERREIRA et al., 2008).

A avaliação final dos custos adaptativos de culturas e/ou plantas daninhas em ambientes agrícolas deve considerar a produção de sementes e outros componentes de produtividade que impactam o ciclo de vida e as práticas de manejo para biótipos resistentes a herbicidas (VILA-AUB et al., 2015). Comparando os genótipos em relação as suas principais características reprodutivas, foi constatada diferenças significativas para número de espiguetas por espiga (NEE) e espiga por planta (NEP) bem como para o peso de mil sementes (PMS) e número de sementes produzidas por planta (Tabela 18).

Tabela 18- Componentes de produtividade do azevém diploide (BRS Ponteio) e tetraploide (INIA Winter Star) ao final do ciclo de vida. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019.

Componente de produtividade	Azevém		C.V. (%)
	diploide	tetraploide	
Nº de espigas por planta (NEP)	64*	88	15,73
Nº de espiguetas por espiga (NEE)	20,6*	28,8	8,21
Peso de mil sementes (g) (PMS)	2,58*	3,14	4,12
Nº de sementes por planta (NSP)	12147*	20513	12,54

*significativo pelo teste t ($p \leq 0,05$) ao comparar os genótipos de azevém para cada variável resposta.

Para azevém tetraploide foi evidenciado maior NEP, NEE, PMS e número de sementes de sementes produzidas por planta comparado ao azevém diploide

(Tabela 18). Resultados similares foram obtidos em azevém onde uma planta adulta pode produzir entre 2000 até mais de 20000 sementes (BUSI et al., 2008; FERNÁNDEZ-MORENO et al., 2017). Os resultados obtidos para azevém tetraploide são decorrentes do melhoramento genético que possibilitou aumento na quantidade de afilhos férteis, maior área foliar e maior comprimento de espigas, contribuindo para o aumento no número de espiguetas e de sementes produzidas (MANDIĆ et al., 2014). Resultados similares foram reportados para azevém tetraploide onde houve maior produção de massa seca e maior número de sementes produzidas comparado a plantas diploides (NAIR, 2004; GILLILAND; JOHNSTON; CONNOLLY, 2007). Além disso, a duplicação cromossômica favorece para aumento de tamanho das sementes e maior PMS, características importantes para o desenvolvimento inicial de plântulas (MANDIĆ et al., 2014; BUSTAMANTE et al., 2015).

A ausência de custos de adaptativos do azevém tetraploide comparado ao diploide é um fator que pode contribuir no manejo da resistência, favorecendo a sustentabilidade dos sistemas de produção agrícola. Além disso, a substituição do azevém diploide pelo tetraploide pode oferecer vantagens como maior produção de matéria seca e maior tolerância a estresses (RANNEY, 2006). Todavia, controle de azevém tetraploide requer cuidados maiores quanto a dessecação devido a maior tolerância a herbicidas onde foram reportados a necessidade de doses 1,76 vezes maiores de glifosato para obter o mesmo nível de controle (DORS et al., 2010). Como prática de manejo, a ausência do herbicida como agente selecionador de biótipos resistentes e/ou o uso de culturas com maior habilidade competitiva podem favorecer os custos adaptativos negativos e, proporcionar redução de plantas daninhas resistentes no tempo em uma determinada área (KESHTKAR et al., 2019).

5.3.3 Habilidade competitiva de *Lolium multiflorum* Lam. diploide e tetraploide em sistemas agrícolas.

Os resultados de produtividade relativa (PR) dos genótipos para as variáveis número de afilhos planta⁻¹ (NA), estatura de plantas (EP), área foliar (AF) e massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA) conduzidos em série de substituição evidenciaram maior vantagem competitiva para o azevém tetraploide comparado ao azevém diploide (Figura 44, Tabela 19, 20 e 21).

Aumento significativo na PR do azevém tetraploide foi constatado para as variáveis NA, AF e MMSPA na proporção 25:75, demonstrando que a competição interespecífica com o azevém diploide causa menor dano sobre a PR comparado a competição intraespecífica. Todavia, independente da proporção, a linha côncava evidenciada para o azevém diploide demonstra que o azevém tetraploide causou interferência negativa sobre a PR, exceto para EP onde os valores não diferiram da linha hipotética nas proporções de 75:25 e 25:75 (Figura 44, Tabela 19). Resultados similares sobre vantagem competitiva de cultivares tetraploides de *L. perenne* L. em competição com cultivares diploides foram reportados com maior PR e uso mais eficiente dos recursos do ambiente (GILLILAND et al., 2011; GRIFFITH et al., 2016).

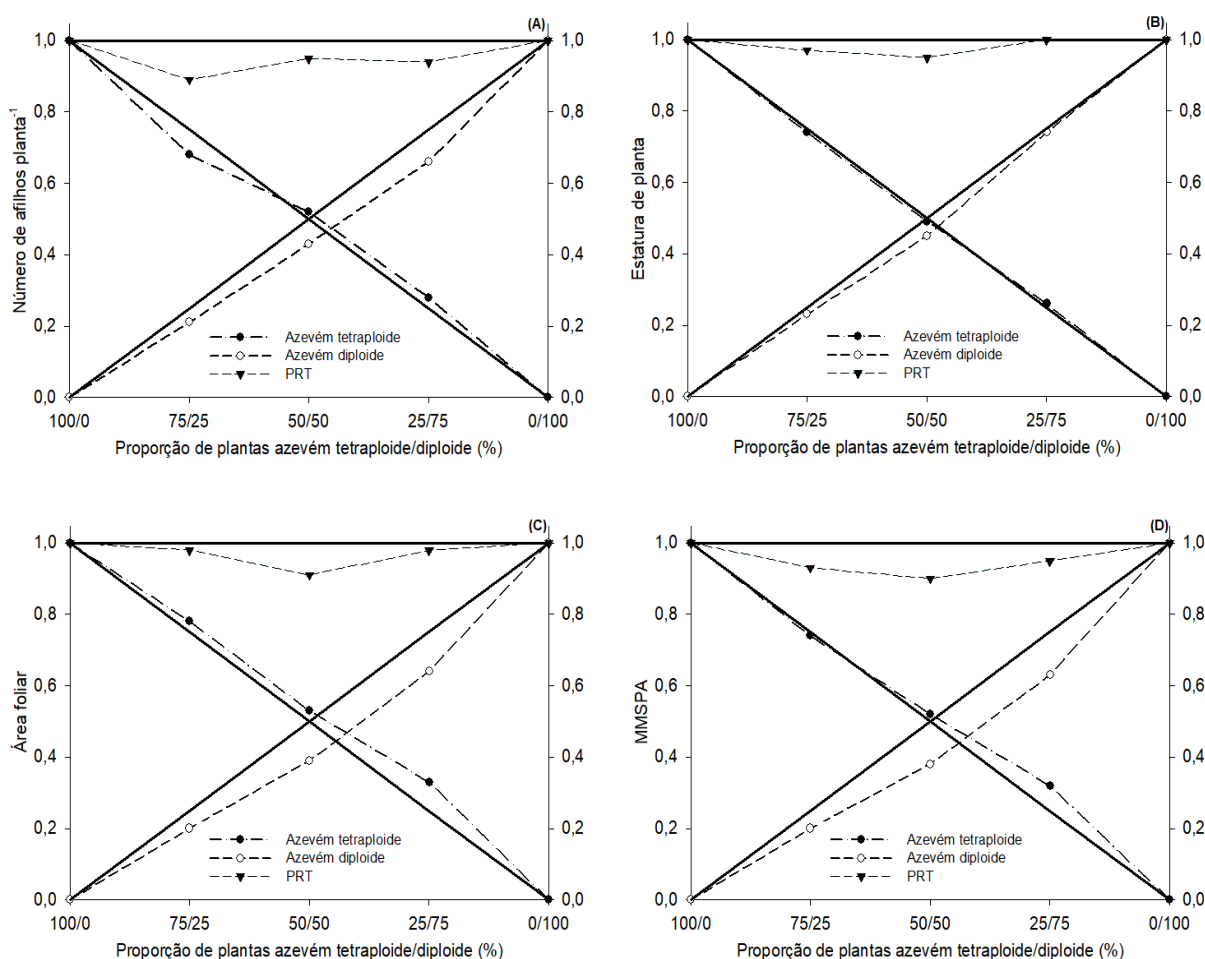


Figura 32- Produtividade relativa (PR) e total (PRT) para número de afilhos (A), estatura de plantas (B), área foliar (C) e MMSPA (D) do azevém tetraploide (Winter Star) e diploide (BRS Ponteio) submetidos a série de substituição. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019. Círculos hachurados (●) representam a PR do genótipo de azevém tetraploide, os círculos abertos (○) representam a PR do genótipo diploide e, os triângulos (▼) indicam a PRT. Linhas contínuas demonstram a produtividade relativa hipotética na ausência de interferência.

Em sistemas agrícolas, a competição entre plantas cultivadas e daninhas é considerada indesejada devido as diversas mudanças fisiológicas e morfológicas que podem ocorrer em função dos processos dependentes dos recursos limitados do nicho ecológico (HARPER, 1977). Todavia, a limitação de recursos durante o desenvolvimento depende da população infestante e do estágio fenológico das plantas quando em competição (PAGE, 2010; MAZZA; BALLARÉ, 2015). Além disso, diferenças de habilidade competitiva entre plantas devem ser consideradas quando duas ou mais proporções forem estatisticamente diferentes (BIANCHI, et al., 2006), permitindo avaliar mais adequadamente sua aptidão em ocupar determinado nicho ecológico (ORR, 2009).

Tabela 19- Diferenças relativas de produtividade (PR) e produtividade relativa total (PRT) para as variáveis número de afilhos planta⁻¹, estatura de plantas, área foliar e massa da matéria seca da parte aérea, nas proporções de plantas de azevém tetraploide (INIA Winter Star) e azevém diploide (BRS ponteio). FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019.

Genótipo	Proporção (%) de plantas associadas (tetraploide:diploide)		
	75:25	50:50	25:75
	Número de afilhos planta⁻¹		
Tetraploide	-0,07 (±0,06) ^{ns}	0,02 (±0,03) ^{ns}	0,03(±0,01)*
Diploide	-0,04(±0,01)*	-0,07 (±0,01)*	-0,09 (±0,03)*
Total	0,89 (±0,05)*	0,95 (±0,04) ^{ns}	0,94 (±0,03) ^{ns}
	Estatura de plantas		
Tetraploide	-0,01 (±0,03) ^{ns}	-0,01(±0,02) ^{ns}	0,01(±0,01) ^{ns}
Diploide	-0,02 (±0,02) ^{ns}	-0,05 (±0,01)*	-0,01 (±0,02) ^{ns}
Total	0,97 (±0,03) ^{ns}	0,95 (±0,02)*	1,00 (±0,03) ^{ns}
	Área foliar		
Tetraploide	0,03 (±0,04) ^{ns}	0,03 (±0,03) ^{ns}	0,08 (±0,03)*
Diploide	-0,05 (±0,03)*	-0,11 (±0,02)*	-0,11 (±0,01)*
Total	0,98 (±0,02) ^{ns}	0,91 (±0,01)*	0,98 (±0,03) ^{ns}
	Massa da matéria seca da parte aérea		
Tetraploide	-0,01 (±0,05) ^{ns}	0,02 (±0,03) ^{ns}	0,07 (±0,03)*
Diploide	-0,05 (±0,03)*	-0,12 (±0,03)*	-0,12 (±0,03)*
Total	0,93 (±0,07) ^{ns}	0,90 (±0,05)*	0,96 (±0,04) ^{ns}

Os valores entre parênteses representam os erros padrões das médias. *significativo e ^{ns}não significativo pelo teste t (p≤0,05).

Os resultados de PRT para as variáveis EP, AF e MMSPA demonstraram redução significativa apenas na proporção 50:50, exceto para NA onde diferenças foram evidenciadas apenas na proporção 75:25 (Tabela 19). Em espécies gramíneas, o aumento populacional tende a reduzir o número de afilhos planta⁻¹ e causar maior estatura de plantas, favorecendo a captação de luz (FLECK et al.,

2006). Resultados semelhantes foram encontrados para competição de azevém com a cultura do trigo onde houve redução da área foliar, menor massa seca e menor número de afilhos por planta (PAULA et al., 2011).

Tabela 20- Respostas para número de afilhos planta⁻¹, estatura de plantas, área foliar e massa da matéria seca da parte aérea do azevém diploide (BRS Ponteio) competindo com azevém tetraploide (Winter Star) sob diferentes proporções de plantas. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019.

Genótipo	Proporção de plantas associadas (tetraploide:diploide)					CV (%)
	100:0	75:25	50:50	25:75	0:100	
	Número de afilhos planta⁻¹					
Tetraploide	5,74	6,42 ^{ns}	5,94 ^{ns}	5,24 ^{ns}	-	8,21
Diploide	-	3,98*	4,15 ^{ns}	4,24 ^{ns}	4,84	9,74
	Estatura de plantas (cm)					
Tetraploide	42,14	41,61 ^{ns}	41,54 ^{ns}	43,54 ^{ns}	-	6,87
Diploide	-	39,32*	38,41*	41,91 ^{ns}	42,32	6,43
	Área Foliar (cm²/planta)					
Tetraploide	66,07	68,67 ^{ns}	69,58 ^{ns}	87,63*	-	8,32
Diploide	-	46,84*	46,47*	51,44*	59,87	7,88
	Massa da matéria seca da parte aérea (g/planta)					
Tetraploide	0,32	0,32 ^{ns}	0,33 ^{ns}	0,41*	-	8,46
Diploide	-	0,25*	0,24*	0,28 ^{ns}	0,32	9,08

*significativo em relação ao respectivo monocultivo pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). ^{ns}não significativo.

Para o genótipo diploide houve redução significativa para todas as variáveis morfológicas em função do aumento da proporção do azevém tetraploide. Todavia, não foi constatada mudanças significativas no azevém tetraploide nas diferentes proporções para as variáveis NA e EP, exceto para AF e MMSPA na proporção 25:75, onde houve aumento de 32% em relação ao monocultivo (Tabela 20).

A partir desses resultados podemos evidenciar que aumentando a proporção do azevém tetraploide ocorre maior interferência sobre as variáveis avaliadas do azevém diploide, enquanto que a diminuição da população do tetraploide favorece o seu desenvolvimento, visto que a competição intraespecífica foi mais prejudicial (Tabela 20). Resultados semelhantes foram obtidos para genótipos de *L. perene* L. submetidos a competição onde plantas tetraploides apresentaram melhor desenvolvimento e foram mais competitivas que indivíduos diploides no uso de recursos do ambiente e ocupação do espaço (GILLILAND et al., 2011). Em revisão recente sobre os efeitos da interferência foi evidenciado que a competição

intraespecífica foi até cinco vezes mais prejudicial que a competição interespecífica (ADLER et al., 2018). Para cenários onde a competição interespecífica é mais fraca do que na competição intraespecífica, cada espécie presente em uma comunidade limita seu crescimento populacional mais do que limita o crescimento populacional de seus competidores, tendo como resultado uma dependência de frequência negativa proporcionando aumento na taxa de crescimento populacional para evitar a exclusão competitiva (CHESSON, 2013).

Ao avaliar os índices de competitividade, os resultados demonstraram que o crescimento relativo do azevém tetraploide foi superior ao azevém diploide com dominância sobre o competidor, conforme indicado pelos índices K e A (Tabela 21). Resultados similares foram encontrados para cultivares tetraploides de *L. perene* L. onde a habilidade competitiva foi superior a cultivares diploides (GILLILAND et al., 2011). No entanto, as estratégias de manejo de plantas daninhas devem considerar a população, o arranjo espacial e a proporção de plantas nas associações visto que diferenças da estrutura do dossel para genótipos com níveis de ploidia distinto afetam a habilidade competitiva (GRIFFITH et al., 2016).

Tabela 21- Índices de competitividade de azevém tetraploide (Winter Star) competindo com azevém diploide (BRS Ponteio) expressos através da competitividade relativa (CR), coeficientes de agrupamento relativo (Ka e Kb) e competitividade (C). FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2019.

	CR	Ka	Kb	C
Nº afilhos	1,21 ($\pm 0,08$)*	1,08 ($\pm 0,06$)*	0,75 ($\pm 0,04$)	0,09 ($\pm 0,03$)*
Estatura	1,09 ($\pm 0,03$)*	0,97 ($\pm 0,07$) ^{ns}	0,83 ($\pm 0,01$)	0,04 ($\pm 0,01$)*
Área foliar	1,36 ($\pm 0,07$)*	1,12 ($\pm 0,09$)*	0,64 ($\pm 0,04$)	0,14 ($\pm 0,04$)*
MMSPA	1,38 ($\pm 0,07$)*	1,10 ($\pm 0,05$)*	0,61 ($\pm 0,06$)	0,14 ($\pm 0,04$)*

Ka - azevém tetraploide; Kb - azevém diploide; ^{ns}não significativo e *significativo pelo teste t ($p \leq 0,05$). Valores entre parênteses representam os erros padrões das médias.

Para avaliação a nível ecológico, o entendimento dos efeitos da competição para uma espécie a longo prazo depende do comportamento na ausência de competidor, da dominância competitiva e da resposta individual para a competição intraespecífica (HART; FRECKLETON; LEVINE, 2018). Dessa forma, é importante avaliar o efeito competitivo (supressão de plantas vizinhas) e a capacidade em tolerar a competição a longo prazo, visto que a coexistência da competição intra e interespecífica causa impactos sobre a dinâmica populacional devido as reduções

na sobrevivência e crescimento de plantas com redução na taxa reprodutiva (ASCHEHOUG et al., 2016).

A partir dos índices de competitividade ($CR > 1$; $K_a > K_b$ e $C > 0$), podemos afirmar que o genótipo tetraploide apresentou maior potencial competitivo e pode ser utilizado como cultura alternativa no manejo integrado para reduzir a frequência de azevém diploide resistente a herbicidas. Todavia, a capacidade competitiva dos genótipos de azevém pode ser afetada pelo ambiente, fertilidade do solo, parâmetros edáficos, época de semeadura, características intrínsecas da cultivar e pelas práticas de manejo como a presença de animais e frequência de pastejo, devendo ser adotada com critério para garantir sustentabilidade aos sistemas agrícolas do Sul do Brasil.

5.4 Conclusões

O azevém tetraploide Winter Star apresenta maior ciclo de vida comparado ao azevém diploide BRS Ponteio, com maior duração do período de afilhamento.

O valor adaptativo e a habilidade competitiva do azevém tetraploide cultivar Winter Star é superior ao diploide BRS Ponteio, podendo ser incluído em estratégias de manejo para redução de populações resistentes aos herbicidas.

6. CONCLUSÕES GERAIS

O screening inicial demonstra que aproximadamente 45% dos biótipos de azevém coletados no Estado do Rio Grande do Sul sobreviveram a aplicação de glifosato na dose de 2160 g e.a. ha⁻¹.

A curva dose resposta comprova a resistência do biótipo SVA04 ao herbicida glifosato onde são necessárias doses 9 vezes superiores para obter a GR₅₀ comparado ao biótipo suscetível SVA02.

A análise de transcriptoma para o biótipo resistente evidencia que 102 e 50 DEGs foram up- e down-regulated, respectivamente, com expressão de genes relacionados ao não local alvo de ação do herbicida. A RT-qPCR comprovou expressão relativa superior dos genes citocromo P₄₅₀, proteína detox, glicosiltransferases, ABC transportes (ABC 2 e ABC 4) peroxidases e outros genes em resposta ao herbicida glifosato no biótipo resistente.

A avaliação *in vivo* do mecanismo de resistência do biótipo SVA04 confirma que não há mutação e amplificação de cópias do gene EPSPs, mas redução no acúmulo de chiquimato, metabolismo parcial ao herbicida após uso de inibidores da citocromo P₄₅₀ e atividade diferencial para as enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase e TBARs após exposição do herbicida glifosato.

A viabilidade das sementes de azevém no banco do solo é baixa e inferior a 540 dias após enterrio para as camadas até 5cm, aumentando para enterrio a 10 e 20cm de profundidade.

A superação da dormência das sementes envolve maiores quantidades de AIA ao longo do tempo como um importante sinalizador, embora possam haver outros mecanismos intrínsecos no controle da dormência que não foram superados após uso de promotores da germinação.

O uso de centeio, ervilhaca e aveia-preta como culturas supressoras diminuem a infestação de azevém e o banco de sementes do solo. De maneira similar, a utilização de milho como cultura sucessora de verão com semeadura mais precoce comparado a soja permite reduzir a realimentação dos bancos de sementes, independente do manejo físico ou mecânico adotado na pré-semeadura. Para a sucessão com soja, a utilização de arado ou fenação são consideradas práticas que auxiliam na redução da população infestante e banco de sementes do solo.

Na cultura do trigo, os herbicidas piroxasulfone e alachlor na dose de 100 e 2400 g i.a. ha⁻¹, respectivamente, são seletivos a cultura e proporcionam altos níveis de controle do azevém resistente ao glifosato, protegendo o potencial produtivo comparado a outras moléculas herbicidas usadas na pré-emergência.

Os herbicidas paraquat, glufosinato de amônia, cletodim e iodosulfurometílico causam inviabilização das sementes de azevém superior a 98% para aplicações realizadas até estágio fenológico de pré-espiga.

O azevém tetraploide Winter Star apresenta maior ciclo de vida com aumento no período de afilamento, maior valor adaptativo e habilidade competitiva comparado ao azevém diploide BRS Ponteio, sendo considerada uma opção para substituição do azevém resistente a herbicidas.

REFERÊNCIAS

AARSSSEN, L.W. Ecological combining ability and competitive combining ability in plants: toward a general evolutionary theory of coexistence in systems of competition. **The American Naturalist**, v.122, n.6, p.707-731, 1983.

ADLER, P.B.; SMULL, D.; BEARD, K.H.; CHOI, R.T.; FURNISS, T.; KULMATISKI, A.; MEINERS, J.M.; TREDENNICK, A.T.; VEBLLEN, K.E. Competition and coexistence in plant communities: intraspecific competition is stronger than interspecific competition. **Ecology Letters**, v.21, n.6, p.1319-1329, 2018.

AGOSTINETTO, D.; RIGOLI, R.P.; SCHAEGLER, C.E.; TIRONI, S.P.; SANTOS, L.S. Período crítico de competição de plantas daninhas com a cultura do trigo. **Planta Daninha**, v.26, n.2, p.271-278, 2008.

AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. (Eds). Resistencia de plantas daninhas a herbicidas no Brasil. 2014. 2ed. Editora UFPel. 398p.

AGOSTINETTO, D.; PERBONI, L.T.; LANGARO, A.C.; GOMES, J.; FRAGA, D.S.; FRANCO, J.J. Changes in photosynthesis and oxidative stress in wheat plants submitted to herbicides application. **Planta Daninha**, v.34, n.1, p.1-9, 2016.

AGOSTINETTO, D.; VARGAS, A.A.M.; RUCHEL, Q.; SILVA, J.D.G.; VARGAS, L. Germination, viability and longevity of horseweed (*Coryza* spp.) seeds as a function of temperature and evaluation periods. **Ciência Rural**, v.48, n.9, e20170687, 2018.

AGOSTINETTO, D.; BENEMANN, D.P.; CECHIN, J.; NOHATTO, M.A.; LANGARO, A.C.; PIASECKI, C.; VARGAS, L. Gene expression related to oxidative stress induced by herbicides in rice. **Agronomy Journal**, v.111, n.3, p.1-8, 2019.

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofitcons/principal_agrofit_cons> Acesso em: 22 nov. 2018.

AHMAD-HAMDANI, M.S.; YU, Q.; HAN, H.; CAWTHRAY, G.R.; WANG, S.F. POWLES, S.B. Herbicide resistance endowed by enhanced rates of herbicide metabolism in Wild Oat (*Avena* spp.), **Weed Science**, v.61, n.1, p.55-62, 2013.

AHSAN, N.; LEE, D.G.; LEE, K.W.; ALAM, I.; LEE, S.H.; BAHK, J.D.; LEE, B.H. Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.46, n.12, p.1062-1070, 2008.

ALARCÓN-REVERTE, R.; GARCÍA, A.; URZÚA, J.; FISCHER, A.J. Resistance to glyphosate in junglerice (*Echinochloa colona*) from California. **Weed Science**, v.61, n.1, p.48-55, 2013.

ALVAREZ, R.C.F.; CRUSCIOL, C.A.C.; NASCENTE, A.S. Análise de crescimento e produtividade de cultivares de arroz de terras altas dos tipos tradicional, intermediário e moderno. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.42, n.4, p.397-406, 2012.

ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOFT, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v.64, n.15, p.5245-5250, 2004.

APWEILER, R.; BAIROCH, A.; WU, CH.; BARKER, W.C.; BOECKMANN, B.; FERRO, S.; GASTEIGER, E.; HUANG, H.; LOPEZ, R.; MAGRANE, M.; MARTIN, M.J.; NATALE, D.A.; O'DONOVAN, C.; REDASCHI, N.; YEH, L.S. UniProt: the Universal Protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v.32, n.1, p.115-119, 2004.

ARMENGOT, L.; JOSÉ-MARÍA, L.; CHAMORRO, L.; SANS, F.X. *Avena sterilis* and *Lolium rigidum* infestations hamper the recovery of diverse arable weed communities. **Weed Research**, v.57, n.4, p.278-286, 2017.

ASCHEHOUG, E.T.; BROOKER, R.; ATWATER, D.Z.; MARON, J.L.; CALLAWAY, R.M. The mechanisms and consequences of inter-specific competition among plants. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v.47, n.11, p.263-281, 2016.

AVILA, L.A.; LEE, D.J.; SENSEMAN, S.A.; MCCAULEY, G.N.; CHANDLER, J.M.; COTHERN, J.T. Assessment of acetolactate synthase (ALS) tolerance to imazethapyr in red rice ecotypes (*Oryza* spp) and imidazolinone tolerant/resistant rice (*Oryza sativa*) varieties. **Pest Management Science**, v.61, n.2, p.171-178, 2005.

BAJWA, A.A.; WALSH, M.; CHAUHAN, B.S. Weed management using crop competition in Australia. **Crop Protection**, v.95, n.5, p.8-13, 2017.

BALBINOT JR., A.A.; MORAES, A.; BACKES, R.L. Efeito de coberturas de inverno e sua época de manejo sobre a infestação de plantas daninhas na cultura de milho. **Planta Daninha**, v.25, n.3, p.473-480, 2007.

BALBINOT JR, A.A.; FLECK, N.G.; MENEZES, V.G.; AGOSTINETTO, D. Competitividade de cultivares de arroz irrigado com cultivar simuladora de arroz-vermelho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.1, p.53-59, 2003.

- BALOCCHI, O.A.; LÓPEZ, I.L. Herbage production, nutritive value and grazing preference of diploid and tetraploid perennial ryegrass cultivars (*Lolium perenne* L.). **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.69, n.3, p.331-339, 2009.
- BARAIBAR, B.; HUNTER, M.C.; SCHIPANSKI, M.E.; HAMILTON, A.; MORTENSEN, D.A. Weed suppression in cover crop monocultures and mixtures. **Weed Science**, v.66, n.1, p.121-133, 2018.
- BARARPOUR, T., KORRES, N.E., BURGOS, N.R., HALE, R.R., TSENG, M.P. Performance of pinoxaden on the control of diclofop-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* L. ssp. *multiflorum*) in winter wheat. **Agriculture**, v.8, n.114, p.1-12, 2018.
- BARTH NETO, A.; SAVIAN, J.V.; SCHONS, R.M.T.; BONNET, O.J.F.; CANTO, M. W.; MORAES, A.; LEMAIRE, G.; CARVALHO, P.C.F. Italian ryegrass establishment by self-seeding in integrated crop-livestock systems: Effects of grazing management and crop rotation strategies. **European Journal of Agronomy**, v.53, n.1, p.67-73, 2014.
- BATLLA, D.; BENECH-ARNOLD, R.L. Predicting changes in dormancy level in weed seed soil banks: implications for weed management. **Crop Protection**, v.26, n.3, p.189-197, 2007.
- BELLÉ, C.; KULCZYNSKI, S.T.; BASSO, C.J.; KASPARY, T.E.; LAMEGO, F.P.; PINTO, M.A.B. Yield and quality of wheat seeds as a function of desiccation stages and herbicides. **Journal of Seed Science**, v.36, n.1, p.63-70, 2014.
- BENACH-ARNOLD, R.L.; SANCHEZ, R.A.; FORCELLA, F.; KRUK, B.C.; GHERSA, C.M. Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. **Field Crops Research**, v.67, n.1, p.105-122, 2000.
- BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: Funep, 2003. 41p.
- BHATT, I.; TRIPATHI, B.N. Plant peroxiredoxins: Catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. **Biotechnology Advances**, v.29, n.6, p.850-859, 2011.
- 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, n.5, p.1380-1387, 2006.
- BLEIHOLDER, H., T. VAN DEN BOOM, L. BUHR, C. FELLER, H. HACK, M. HESS, R. KLOSE, P. D. LANCASHIRE, U. MEIER, P. MUNGER, R. STAUSS, E. WEBER 1997: **Compendium of growth stage identification keys for mono- and dicotyledonous plants**. 2ed., Novartis, Basel, 1997. 103p.
- BOLGER, A.M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v.30, n.15, p.2114-2120, 2014.

BOND, J.A.; EUBANK, T.W.; BOND, R.C.; GOLDEN, B.R.; EDWARDS, H.M. Glyphosate-resistant (*Lolium perenne* spp. *multiflorum*) control with fall-applied residual herbicides. **Weed Technology**, v.28, n.2, p.361-370, 2014.

BOUSALIS, P.; GILL, G.S.; PRESTON, C. Control of rigid ryegrass in Australian wheat production with pyroxasulfone. **Weed Technology**, v.28, n.2, p.332-339, 2014.

BOWLES, D.; ISAYENKOVA, J.; LIM, E.K.; POPPENBERGER, B. Glycosyltransferases: managers of small molecules. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, n.3, p.254-263, 2005.

BRACAMONTE E., FERNÁNDEZ-MORENO P. T., BARRO F., DE PRADO R. Glyphosate-resistant *Parthenium hysterophorus* in the Caribbean islands: non-target site resistance and target site resistance in relation to resistance levels. **Frontiers in Plant Science**, v.7, n.1845, p.1-13, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 399p.

BRAVO, W.; LEON, R.G.; FERRELL, J.A.; MULVANEY, M.J.; WOOD, C.W. Differentiation of life-history traits among Palmer amaranth populations (*Amaranthus palmeri*) and its relation to cropping systems and glyphosate sensitivity. **Weed Science**, v.65, n.3, p.339-349, 2017.

BRAY, N.L.; PIMENTEL, H.; MELSTED, P.; PACHTER, L. NEAR-optimal probabilistic RNA-seq quantification. **Nature Biotechnology**, v.34, n.4, p.525-527, 2016.

BRIGHENTI, A.M.; SILVA, J.F.; LOPES, N.F. Crescimento e partição de assimilados em losna. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.5, n.1, p.41-45, 1993.

BROOM, B.M.; RYAN, M.C.; BROWN, R.E.; IKEDA, F.; STUCKY, M.; KANE, D.W.; MELOTT, J.; WAKEFIELD, C.; CASASANT, T.D.; AKBANI, R.; WEINSTEIN, J.N. A galaxy implementation of next-generation clustered heatmaps for interactive exploration of molecular profiling data. **Cancer Research**, v.77, n.21, p.23-26, 2017.

BROWN, D. Estimating the composition of a forest seed bank: a comparison of the seed extraction and seedling emergence methods. **Canadian Journal of Botany**, v.70, n.8, p.1603-1612, 1992.

BUCHFINK, B.; XIE, C.; HUSON, D.H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nature Methods**, v.12, n.11, p.59-60, 2015.

BUONO, D.D.; LOLI, G.; NASINI, L.; PROJETTI, P. A Comparative study on the interference of two herbicides in wheat and Italian ryegrass and on their antioxidant activities and detoxification rates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.22, p.12109-12115, 2011.

BURGOS, N.R.; TRANEL, P.J.; STREIBIG, J.C. Review: Confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. **Weed Science**, v.26, n.1, p.151-155, 2013.

BURNS, A., OLSZOWY, P., CIBOROWSKI, P. Biomolecules. In: CIBOROWSKI, P.; SILBERRING, J. (Eds.). **Proteomic profiling and analytical chemistry**. 2ed. Kraków: Springer. 2016. p.7-24.

BUSHNELL, B. Bbmap - **A suite of bioinformatics tools**. Disponível em: <<https://sourceforge.net/projects/bbmap/>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

BUSI, R.; NEVE, P.; POWLES, S. Evolved polygenic herbicide resistance in *Lolium rigidum* by low-dose herbicide selection within standing genetic variation. **Evolutionary Applications**, v.6, n.2, p.231-242, 2013.

BUSI, R.; YU, Q.; BARRETT-LENNARD, R.; POWLES, S. Long distance pollen-mediated flow of herbicide resistance genes in *Lolium rigidum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.117, n.8, p.1281-1290, 2008.

BUSTAMANTE, F.O.; ROCHA, L.C.; SANTOS, N.S.; SILVEIRA, R.A.D.; NUNES, R. C.; MITTELMANN, A.; TECHIO, V.H. Analysis of nuclear DNA content and chromosome number for screening genotypes and crosses in annual ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). **Australian Journal of Crop Science**, v.9, n.7, p.666-670, 2015.

BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.29, n.1, p.23-39, 2002.

CALDANA, C.; SCHEIBLE, W.R.; MUELLER-ROEBER, B.; RUZICIC, S. A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. **Plant Methods**, v.3, n.7, p.1-9, 2007.

CALSINA, L.M.; AGNUSDEI, M.G.; ASSUERO, S.G.; PÉREZ, H. Size/density compensation in *Chloris gayana* Kunth cv. Fine Cut subjected to different defoliation regimes. **Grass and Forage Science**, v.67, n.2, p.255-262, 2012.

CAMPOS, C.F.; MARTINS, D.; COSTA, A.C.P.R.; PEREIRA, M.R.R.; CARDOSO, L. A.; MARTINS, C.C. Efeito de herbicidas na dessecação e germinação de sementes remanescentes de *Lolium multiflorum* L. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.6, p.2067-2074, 2012.

CARVALHO, L.B.; ALVES, P.L.D.C.A.; GONZÁLEZ-TORRALVA, F.; CRUZ-HIPOLITO, H.E.; ROJANO-DELGADO, A.M.; DE PRADO, R.; GIL-HUMANES, J.; BARRO, F.; DE CASTRO, M.D.L. Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.60, n.2, p.615-622, 2012.

- CASTRO, G.S.A.; CRUSCIOL, C.A.C.; NEGRISOLI, E.; PERIM, L. Sistemas de produção de grãos e incidência de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 29, n.spe., p.1001-1010, 2011.
- CASTRO, R.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed. 2004. p.149-162.
- CHAUHAN, B.S.; GILL, G.; PRESTON, C. Influence of environmental factors on seed germination and seedling emergence of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). **Weed Science**, v.54, n.6, p.1004-1012, 2006.
- CHEE-SANFORD, J.C.; WILLIAMS, M.M.; DAVIS, A.S.; SIMS, G.K. Do microorganisms influence seed-bank dynamics? **Weed Science**, v.54, n.3, p.575-587, 2006.
- CHEN, J.; HUANG, H.; WEI, S.; HUANG, Z.; WANG, X.; ZHANG, C. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in goosegrass (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.) by RNA sequencing technology. **The Plant Journal**, v.89, n.2, p.407-415, 2017.
- CHEN, J.; HUANG, H.; ZHANG, C.; WEI, S.; HUANG, Z.; CHEN, J.; WANG, X. Mutations and amplification of EPSPS gene confer resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*). **Planta**, v.242, n.4, p.859-868, 2015.
- CHEN, L.; ZHONG, H.Y.; KUANG, J.F.; LI, J.G.; LU, W.J.; CHEN, J.Y. Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. **Planta**, v.234, n.2, p.377-390, 2011.
- CHESSON, P. **Species Competition and Predation**. In: LEEMANS, R. (Ed.) Ecological Systems. New York: Springer. 2013. p.223-256.
- CHOUDHURY, F.K.; RIVERO, R.M.; BLUMWALD, E.; MITLLER, R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **Plant Journal**, v.90, n.5, p.856-867, 2017.
- CHRISTOFFOLETI, P.J. Análise comparativa do crescimento de picão-preto (*Bidens pilosa*) resistente e suscetível aos herbicidas inibidores da ALS. **Planta Daninha**, v.19, n.1, p.75-83, 2001.
- CHRISTOFFOLETI, P.J. Curvas de dose-resposta de biótipos resistente e suscetível de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da ALS. **Scientia Agricola**, v.59, n.3, p.513-519, 2002.
- CLARKE, B.; RAHMAN, S. A microarray analysis of wheat grain hardness. **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, n.7, p.1259-1267, 2005.
- CLEMENTS, D.R.; BENOIT, D.L.; SWANTON, C.J. Tillage effects on weed seed return and seedbank composition. **Weed Science**, v.44, n.2, p.314-322, 1996.

COCK, P.J.A.; CHANG, J.T.; CHAPMAN, B.A.; COX, C.J.; DALKE, A.; FRIEDBERG, I.; HAMELRYCK, T.; KAUFF, F.; WILCZYNSKI, B.; HOON, M.J.L. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. **Bioinformatics**, v.25, n.11, p.1422-1423, 2009.

COLBACH, N.; FERNIERI, A.; LE CORRE, V.; MESSÉAN, A.; DARMENCY, H. Simulating changes in cropping practises in conventional and glyphosate-tolerant maize. I. Effects on weeds. **Environmental Science and Pollution Research International**, v.24, n.12, p.11582-11600, 2017.

COLLAVO, A.; STREK, H.; BEFFA, R. Management of an ACCase-inhibitor resistant *Lolium rigidum* population based on the use of ALS inhibitors: weed population evolution observed over a 7 year field scale investigation. **Pest Management Science**, v.69, n.2, p.200-208, 2013.

CONESA, A.; MADRIGAL, P.; TARAZONA, S.; GOMEZ-CABRERO, D.; CERVERA, A.; MCPHERSON, A.; SZCZEŚNIAK, M.W.; GAFFNEY, D.J.; ELO, L.L.; ZHANG, X.; MORTAZAVI, A. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. **Genome Biology**, v.17, n.1, p.1-19, 2016.

CONSORTIUM, U. Reorganizing the protein space at the Universal protein resource (UniProt). **Nucleic Acids Research**, v.40, n.1, p71-75, 2012.

CROMARTIE, T.H.; POLGE, N.D. An improved assay for shikimic acid and its use as a monitor for the activity of sulfosate. **Proceeding of Weed Science Society America**, v.40, n.1, p.291-292, 2000.

CORREIA, N.M.; DURIGAN, J.C.; KLINK, U.P. Influência do tipo e da quantidade de resíduos vegetais na emergência de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v.24, n.2, p.245-253, 2006.

CUMMINS, I.; BRYANT, D.N.; EDWARDS, R. Safener responsiveness and multiple herbicide resistance in the weed black-grass (*Alopecurus myosuroides*). **Plant Biotechnology Journal**, v.7, n.8, p.807-820, 2009.

DABROWSKA, G.; KATA, A.; GOC, A.; SZECHYŃSKA-HEBDA, M.; SKRZYPEK, E. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. **Acta Biologica Cracoviensia**, v.49, n.1, p.7-17, 2007.

DARMENCY, H. Pleiotropic effects of herbicide-resistance genes on crop yield: a review. **Pest Management Science**, v.69, n.8, p.897-904, 2013.

DAVIS, A.S.; CARDINA, J.; FORCELLA, F. Environmental factors affecting seed persistence of annual weeds across the US corn belt. **Weed Science**, v.53, n.6, p.860-868, 2005.

DAVIS, A.S.; SCHUTTE, B.J.; IANNUZZI, J.; RENNER, K.A. Chemical and physical defense of weed seeds in relation to soil seedbank persistence. **Weed Science**, v.56, n.5, p.676-684, 2008.

DÉLYE, C. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. **Pest Management Science**, v.69, n.2, p.176-187, 2013.

DÉLYE, C.; JASIENIUK, M.; LE CORRE, V. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. **Trends in Genetics**, v.29, n.11, p.649-658, 2013.

DERU, J.; SCHILDER, H.; VAN DER SCHOOT, J.R.; VAN EEKEREN, N. Genetic differences in root mass of *Lolium perenne* varieties under field conditions. **Euphytica**, v.199, n.1, p.223-232, 2014.

DOMBROSKI, J.E.; MARTIN, R.C. Evaluation of reference genes for quantitative RT-PCR in *Lolium temulentum* under abiotic stress. **Plant Science**, v.176, n.3, p.390-396, 2009.

DONOHUE, K.; RUBIO-DE-CASAS, R.; BURGHARDT, L.; KOVACH, K.; WILLIS, C.G. Germination, post-germination adaptation, and species ecological ranges. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.41, n.12, p.293-319, 2010.

DORS, C.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; SANCHOTENE, D.M.; DIAS, A.C.R.; MANFRON, P.A.; DORNELLES, S.H.B. Suscetibilidade de genótipos de *Lolium multiflorum* ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v.28, n.2, p.401-410, 2010.

DUHOUX, A.; CARRERE, S.; GOUZY, J.; BONIN, L.; DÉLYE, C. RNA-Seq analysis of rye-grass transcriptomic response to an herbicide inhibiting acetolactate-synthase identifies transcripts linked to non-target-site-based resistance. **Plant Molecular Biology**, v.87, n.4, p.473-487, 2015.

DUKE, S.O.; POWLES, S.B. Glyphosate-resistant weeds and crops. **Pest Management Science**, v.64, n.4, p.317-318, 2008.

DUKE, S.O. Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and -susceptible crops and weeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.11, p.5835-5841, 2011.

DUKE, S.O. The history and current status of glyphosate. **Pest Management Science**, v.74, n.5, p.1027-1034, 2018.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3ed. Brasília, 2013. 353p.

EVANS, J.A.; TRANEL, P.J.; HAGER, A.G.; SCHUTTE, B.; WU, C.; CHATHAM, L.A.; DAVIS, A.S. Managing the evolution of herbicide resistance. **Pest Management Science**, v.72, n.1, p.74-80, 2016.

FANG, Y.; LU, H.; CHEN, S.; ZHU, K.; SONG, H.; QIAN, H. Leaf proteome analysis provides insights into the molecular mechanisms of bentazon detoxification in rice. **Pesticide and Biochemistry Physiology**, v.125, n.11, p.45-52, 2015.

FAO. Food and Agriculture Organization. **FAOSTAT**. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/E>. Acesso em 05jan 2019.

FENNER, M.; THOMPSON, K. **The Ecology of Seeds**. Cambridge: Cambridge University Press, 2005. 250p.

FERNANDEZ P.; GAUVRIT C.; BARRO F.; MENENDEZ J.; DE PRADO R. First case of glyphosate resistance in France. **Agronomy for Sustainable Development**, v.35, n.4, p.1469-1476, 2015.

FERNÁNDEZ-MORENO, P.T.; CRUZ, R.A.; SMEDA, R.J.; DE PRADO, R. Differential resistance mechanisms to glyphosate result in fitness cost for *Lolium perenne* and *L. multiflorum*. **Frontiers in Plant Science**, v.8, n.10, p.1-16, 2017.

FERREIRA, E.A.; CONCENÇO, G.; SILVA, A.A.; REIS, M.R.; VARGAS, L.; VIANA, R.G.; GUIMARÃES, A.A.; GALON, L. Potencial competitivo de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*). **Planta daninha**, v.26, n.2, p.261-269, 2008.

FEYEREISEN, R. Insect P450 enzymes. **Annual Review of Entomology**, v.44, n.1, p.507-533, 1999.

FLECK, N.G.; BALBINOT JR., A.A.; AGOSTINETTO, D.; VIDAL, R.A. Características de plantas de cultivares de arroz irrigado relacionadas à habilidade competitiva com plantas concorrentes. **Planta Daninha**, v.21, n.1, p.97-104, 2003.

FLECK, N.G.; BIANCHI, M.A.; RIZZARDI, M.A.; AGOSTINETTO, D. Interferência de *Raphanus sativus* sobre cultivares de soja durante a fase vegetativa de desenvolvimento da cultura. **Planta Daninha**, v.24, n.3, p.425-434, 2006.

FLECK, N.G.; LAMEGO, F.P.; SCHAEGLER, C.E.; FERREIRA, F.B. Resposta de cultivares de soja à competição com cultivar simuladora da infestação de plantas concorrentes. **Scientia agrária**, v.8, n.3, p.213-218, 2007.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. **Plant Physiology**, v.155, n.1, p.2-18, 2011.

FRAGA, D.S.; AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L.; NOHATTO, M.A.; THÜRMER, L.; HOLZ, M.T. 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, n.4, p.875-885, 2013.

FRANS, R.; CROWLEY, H. Experimental design and techniques for measuring and analyzing plant responses to weed control practices. In: SOUTHERN WEED SCIENCE SOCIETY. **Research methods in weed science**. 3ed., p.29-45, 1986.

FREITAS-SILVA, L.; RODRÍGUEZ-RUIZ, M.; HOUMANI, H.; SILVA, L.C.; PALMA, J.M.; CORPAS, F.J. Glyphosate-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* affecting peroxisomal metabolism and triggers activity in the oxidative phase of the pentose phosphate pathway (OxPPP) involved in NADPH generation. **Journal of Plant Physiology**, v.218, n.11, p.196-205, 2017.

GAINES, T.A.; ZHANG, W.; WANG, D.; BUKUN, B.; CHISHOLM, S.T.; SHANER, D.L.; NISSEN, S.J.; PATZOLDT, W.L.; TRANEL, P.J.; CULPEPPER, A.S.; GREY, T.L.; WEBSTER, T.M.; VENCILL, W.K.; SAMMONS, R.D.; JIANG, J.; PRESTON, C.; LEACH, J.E.; WESTRA, P. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **PNAS**, v.107, n.3, p.1029-1034, 2010.

GAINES, T.A.; LORENTZ, L.; FIGGE, A.; HERRMANN, J.; MAIWALD, F.; OTT, M.C.; HAN, H.; BUSI, R.; YU, Q.; POWLES, S.B.; BEFFA, R. RNA-Seq transcriptome analysis to identify genes involved in metabolism-based diclofop resistance in *Lolium rigidum*. **Plant Journal**, v.78, n.5, p.865-876, 2014.

GAINES, T.A.; HEAP, I.M. **Mutations in herbicide-resistant weeds to EPSP synthase inhibitors**. Disponível em <<http://www.weedscience.com>>. Acesso em 05 dez. 2018.

GALON, L.; CASTOLDI, C.T.; FORTE, C.T.; KUJAWISKI, R.; DAVID, F.A.; PERIN, G.F.; RADUNZ, A.L.; AGAZZI, L.A.; ROSSETTI, J.; RADUNZ, L.L. Eficácia e fitotoxicidade de herbicidas aplicados para manejo de plantas daninhas infestantes do trigo. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.14, n.2, p.128-140, 2015.

GALON, L.; TIRONI, S.P.; ROCHA, P.R.R.; CONCENÇO, G.; SILVA, A.F.; VARGAS, L.; SILVA, A.A.; FERREIRA, E.A.; MINELLA, E.; SOARES, E.R.; FERREIRA, F.A. Habilidade competitiva de cultivares de cevada convivendo com azevém. **Planta Daninha**, v.29, n.4, p.771-781, 2011.

GALVAN, J.; RIZZARDI, M.A.; PERUZZO, S.T.; OVEREJO, R.F. Evolution of ryegrass seed banks depending on soil tillage and crops. **Planta Daninha**, v.33, n.2, p.183-191, 2015.

GARDARIN, A.; COLBACH, N.; How much of seed dormancy in weeds can be related to seed traits? **Weed Research**, v.55, n.1, p.14-25, 2014.

GE, X.; D'AVIGNON D.A.; ACKERMAN, J.J.H.; SAMMONS, R.D. Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. **Pest Management Science**, v.66, n.4, p.345-348, 2010.

GHERSA, C.M.; MARTINEZ-GHERSA, M.A.; BENECH-ARNOLD, R.L. Using seed dormancy for crop and forage production. **Journal of Production Agriculture**, v.10, n.1, p.111-117, 1997.

GIACOMINI, D.A.; GAINES, T.; BEFFA, R.; TRANEL, P.J. Optimizing RNA-seq studies to investigate herbicide resistance. **Pest Management Science**, v.74, n.10, p.1-14, 2018.

GILLILAND, T.J.; HENNESSY, D.; GRIFFITH, V. Studies into the dynamics of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) seed mixtures. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, v.50, n.1, p.99-112, 2011.

GILLILAND, T.J.; JOHNSTON, J.; CONNOLLY, C. A review of forage grass and clover seed use in Northern Ireland, UK between 1980 and 2004. **Grass and Forage Science**, v.62, n.3, p.239-254, 2007.

GOGGIN, D.E.; NEIL EMERY, R.J.; KUREPIN, L.V.; POWLES, S.B. A potential role for endogenous microflora in dormancy release, cytokinin metabolism and the response to fluridone in *Lolium rigidum* seeds. **Annals of Botany**, v.115, n.2, p.293-301, 2015.

GOGGIN, D.E.; POWLES, S.B.; STEADMAN, K.J. Understanding *Lolium rigidum* seeds: The key to managing a problem weed? **Agronomy**, v.2, n.3, p.222-239, 2012.

GOH, S.S.; YU, Q.; HAN, H.; VILA-AIUB, M.M.; BUSI, R.; POWLES, S.B. Non-target-site glyphosate resistance in *Echinochloa colona* from Western Australia. **Crop Protection**, v.112, n.10, p.257-263, 2018.

GOMES, M.P.; SMEDBOL, E.; CHALIFOUR, A.; HÉNAULT-ETHIER, L.; LABRECQUE, M.; LEPAGE, L.; LUCOTTE, M.; JUNEAU, P. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. **Journal of Experimental Botany**, v.65, n.17, p.4691-4703, 2014.

GONZALEZ-ANDUJAR, J.L.; FERNANDEZ-QUINTANILLA, C. Modelling the population dynamics of annual ryegrass (*Lolium rigidum*) under various weed management systems. **Crop Protection**, v.23, n.8 p.723-729, 2004.

GONZALEZ-TORRALVA, F.; ROJANO-DELGANO, A.M.; LUQUE DE CASTRO, M.D.; MUELEDER, N.; DE PRADO, R. Two non-target mechanisms are involved in glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.) biotypes. **Journal of Plant Physiology**, v.169, n.17, p.1673-1679, 2012a.

GONZALEZ-TORRALVA, F.; GIL-HUMANES, J.; BARROS, F.; BRANTS, I.; DE PRADO, R. Target site mutation and reduced translocation are present in a glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* Lam. biotype from Spain. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.58, n.9, p.16-22, 2012b.

GOULD, F.; BROWN, Z.S.; KUZMA, J. Wicked evolution: Can we address the sociobiological dilemma of pesticide resistance? **Science**, v.360, n.6390, p.728-732, 2018.

GRABHERR, M.G.; HAAS, B.J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J.Z.; THOMPSON, D.A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCELI, E.; HACOEN, N.; GNIRKE, A.; RHIND, N.; DI PALMA, F.; BIRREN, B.W.; NUSBAUM, C.; LINDLAD-TOH, K.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, v.29, n.5, p.644-652, 2011.

GRAEBER, K.; NAKABAYASHI, K.; MIATTON, E.; LEUBNER-METZGER, G.; SOPPE, W.J.J. Molecular mechanisms of seed dormancy. **Plant Cell Environmental**, v.35, n.10, p.1769-1786, 2012.

GREEN, J.M.; OWEN, M.D.K. Herbicide-resistant crops: utilities and limitations for herbicide-resistant weed management. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.11, p.5819-5829, 2011.

GRIFFITH, V.; GILLILAND, T.J.; MCEVOY, M.; O'DONOVAN, M. Competitive dynamics in mixtures of perennial ryegrass cultivars during two growing seasons under two cutting managements. **Crop Pasture Science**, v.67, n.2, p.225-235, 2016.

GUNES, A.; INAL, A.; BAGCI, E.G.; COBAN, S.; PILBEAM, D.J. Silicon mediates changes to some physiological and enzymatic parameters symptomatic for oxidative stress in spinach (*Spinacia oleracea* L.) grown under B toxicity. **Scientia Horticulturae**, v.113, n.2, p.113-119, 2007.

HAAS, B.J.; PAPANICOLAOU, A.; YASSOUR, M.; GRABHERR, M.; BLOOD, P.D.; BOWDEN, J.; COUGER, M.B.; ECCLES, D.; LI, B.; LIEBER, M.; MACMANES, M.D.; OTT, M.; ORVIS, J.; POCHET, N.; STROZZI, F.; WEEKS, N.; WESTERMAN, R.; WILLIAM, T.; DEWEY, C.N.; HENSCHER, R.; LEDUC, R.; FRIDMAN, N.; REGEV, A. *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. **Nature Protocols**, v.8, n.7, p.1494-1512, 2013.

HALL, L.M.; STROMME, K.M.; HORSMAN, G.P. Resistance to acetolactato sintase inhibitors and quinclorac in biotypes of false clover (*Gallium sourium*). **Weed Science**, v.46, n.4, p.390-396, 1998.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids: Symposium Series**, v.41, n.2, p.95-98, 1999.

HARKER, K.N. Slowing weed evolution with integrated weed management. **Canadian Journal of Plant Science**, v.93, n.5, p.759-764, 2013.

HARKER, N.; O'DONOVAN, J.T. Recent weed control, weed management, and integrated weed management. **Weed Technology**, v.27, n.1, p.1-11, 2013.

HARPER, J.L. **Population biology of plants**. London: Academic Press. 1977. 892p.

HARRE, N.T.; YOUNG, J.M.; YOUNG, B.G. Glyphosate-induced antagonism in rapid response Giant ragweed (*Ambrosia trifida*). **Weed Technology**, v.32, n.1, p.52-59, 2018.

HART, S.P.; FRECKLETON, R.P.; LEVINE, J.M. How to quantify competitive ability. **Journal of Ecology**, v.106, n.5, p.1902-1909, 2018.

HEAP, I. **International Survey of Herbicide resistant Weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.125, n.1, p.189-198, 1968.

HENDRICKS, S.B.; TAYLORSON, R.B. Promotion of seed germination by nitrate, nitrite, hydroxylamine, and ammonium salts. **Plant Physiology**, v.54, n.3, p.304-309, 1974.

HOLDSWORTH, M.J.; FINCH-SAVAGE, W.E.; GRAPPIN, P.; JOB, D. Post-genomics dissection of seed dormancy and germination. **Trends in Plant Science**, v.13, n.1, p.7-13, 2008.

JAKELAITIS, A.; SILVA, A.F.; PEREIRA, J. L.; SILVA, A.A.; FERREIRA, L.R.; VIVIAN, R. Efeitos de densidade e época de emergência de *Brachiaria brizantha* em competição com plantas de milho. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.28, n.3, p.373-378, 2006.

JASIENIUK, M.; AHMAD, R.; SHERWOOD, A.M.; FIRESTONE, J.L.; PEREZ-JONES, A.; LANINI, W.T.; MALLORY-SMITH, C.; STEDNICK, Z. Glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in California: distribution, response to glyphosate, and molecular evidence for an altered target enzyme. **Weed Science**, v.56, n.4, p.496-502, 2008.

JASKULSKI, D.; JASKULSKA, I. The effect of pre-harvest glyphosate application on grain quality and volunteer winter wheat. **Romanian Agricultural Research**, v.31, n.31, p.283-289, 2014.

JHA, P.; KUMAR, V.; GODARA, R.K.; CHAUHAN, B.S. Weed management using crop competition in the United States: A review. **Crop Protection**, v.95, n.5, p.31-37, 2017.

KAUNDUN, S.S.; BAILLY, G.C.; DALE, R.P.; HUTCHINGS, S.J.; MCINDOE, E.A. 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. **PlosOne**, v.8, n.2, p.1-11, 2013.

KESHTKAR, E.; ABDOLSHAHI, R.; SASANFAR, H.; ZAND, E.; BEFFA, R.; DAYAN, F.E.; KUDSK, P. Assessing fitness costs from a herbicide-resistance management perspective: A review and insight. **Weed Science**, v.66, n.1, p.1-12, 2019.

KISSMANN, K.G.; **Plantas infestantes e nocivas**. TOMO I. 3ed. São Paulo: Basf Brasileira S.A., 2007. CD-ROM.

KLEEMANN, S.G.L.; PRESTON, C.; GILL, G.S. Influence of management on long-term seedbank dynamics of Rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in cropping systems of Southern Australia. **Weed Science**, v.64, n.2, p.303-311, 2016.

KNEZEVIC, S.Z.; DATTA, A.; SCOTT, J.; PORPIGLIA, P.J. Dose-response curves of KIH- 485 for preemergence weed control in corn. **Weed Technology**, v.23, n.1, p.34-39, 2009.

KREUZ, K.; TOMMASINI, R.; MARTINOIA, E. Old enzymes for a new job. Herbicide detoxification in plants. **Plant Physiology**, v.111, n.2, p.349-353, 1996.

- KRENCHINSKI, F.H.; CESCO, V.J.S.; RODRIGUES, D.M.; PEREIRA, V.G.C.; ALBRECHT, A.J.P.; ALBRECHT, L.P. Yield and physiological quality of wheat seeds after desiccation with different herbicides. **Journal of Seed Science**, v.39, n.3, p.254-261, 2017.
- LAWSON, A.; COGGER, C.; BARY, A.; FORTUNA, A.M. Influence of seeding ratio, planting date and termination date on rye-hairy vetch cover crop mixture performance under organic management. **PlosOne**, v.10, n.6, p.1-19, 2015.
- LE, T.D.; ALDRICH, D.L.; VALLIYODAN, B.; WATANABE, Y.; HA, C.V.; NISHIYAMA, R.; GUTTIKONDA, S.K.; QUACH, T.N.; GUTIERREZ-GONZALEZ, J.J.; TRAN, L.S.P.; NGUYEN, H.T. Evaluation of candidate reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in soybean tissues under various abiotic stress conditions. **PlosOne**, v.7, n.9, p.1-10, 2012.
- LEE, J.M.; ROCHE, J.R.; DONAGHY, D.J.; THRUSH, A.; SATHISH, P. Validation of reference genes for quantitative RT-PCR studies of gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **BMC Molecular Biology**, v.11, n.8, p.1-14, 2010.
- LI, M.; YU, Q.; HAN, H.; VILA-AIUB, M.; POWLES, S.B. ALS herbicide resistance mutations in *Raphanus raphanistrum*: evaluation of pleiotropic effects on vegetative growth and ALS activity. **Pest Management Science**, v.69, n.6, p.689-695, 2013.
- LIANG, L.; LU, Y.L.; YANG, H. Toxicology of isoproturon to the food crop wheat as affected by salicylic acid. **Environmental Science Pollution Research**, v.9, n.6, p.2044-2054, 2012.
- LIU, X.; ZHANG, H.; ZHAO, Y.; FENG, Z.; LI, Q.; YANG, H.Q.; LUAN, S.; LI, J.; HE, Z.H. Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in Arabidopsis. **PNAS**, v.110, n.38, p.1-6, 2013.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-408, 2001.
- LOVE, M.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v.15, n.550, p.1-23, 2014.
- MA S.; NIU, H.; LIU, C.; ZHANG, J.; HOU, C.; WANG, D. Expression stabilities of candidate reference genes for RT-qPCR under different stress conditions in soybean. **PlosOne**, v.8, n.10, p.1-7, 2013.
- MAIA, F.C.; MAIA, M.S.; BEKKER, R.M.; BERTON, R.P.; CAETANO, L.S. *Lolium multiflorum* seeds in the soil: I. Soil seed bank dynamics in a no till system. **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.2, p.100-110, 2008.

MAIA, F.C.; MAIA, M.S.; BEKKER, R.M.; BERTON, R.P.; CAETANO, L.S. *Lolium multiflorum* seed in the soil: II. Longevity under natural conditions. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2, p.123-128, 2009.

MAIN, C.L.; STECKEL, L.E.; HAYESA, R.M.; MUELLER, T.C. Biotic and abiotic factors influence horseweed emergence. **Weed Science**, v.54, n.6, p.1101-1105, 2006.

MALLIK, S.; NAYAK, M.; SAHU, B.B.; PANIGRAHI, A.K.; SHAW, B.P. Response of antioxidant enzymes to high NaCl concentration in different salt-tolerant plants. **Biologia Plantarum**, v.55, n.1, p.191-195, 2011.

MANDIĆ, V.; SIMIĆ, A.; VUČKOVIĆ, S.; STANISAVLJEVIĆ, R.; TOMIĆ, Z.; BIJELIĆ, Z.; KRNJAJA, V. Management practices effect on seed features of Italian ryegrass following storage period. **Biotechnology Animal Husbandry**, v.30, n.1, p.145-152, 2014.

MARIANI, F.; VARGAS, L.; AGOSTINETTO, D.; SILVA, D.R.O.; FRAGA, D.S.; SILVA, B.M. Herança da resistência de *Lolium multiflorum* ao iodosulfurom methyl sodium. **Planta Daninha**, v.33, n.2, p.351-356, 2015.

MAROLI, A.S.; GAINES, T.A.; FOLEY, M.E.; DUKE, S.O.; DOĞRAMACI, M.; ANDERSON, J.V.; HORVATH, D.P.; CHAO, W.S.; THARAYIL, N. Omics in weed science: A perspective from genomics, transcriptomics, and metabolomics approaches. **Weed Science**, v.66, n.6, p.1-15, 2018a.

MAROLI, A.S.; NANDULA, V.K.; DUKE, S.O.; GERARD, P.; THARAYIL, N. Comparative metabolomic Analyses of *Ipomoea lacunosa* biotypes with contrasting glyphosate tolerance captures herbicide-induced differential perturbations in cellular physiology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.66, n.8, p.2027-2039, 2018b.

MAROLI, A.S.; NANDULA, V.K.; DAYAN, F.E.; DUKE, S.O.; GERARD, P.; THARAYIL, N. Metabolic profiling and enzyme analyses indicate a potential role of antioxidant systems in complementing glyphosate resistance in an *Amaranthus palmeri* biotype. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.63, n.41, p.9199-9209, 2015.

MARTENS, M.R.F.; MÜHL, F.R.; BALBINOT, M.; FELDMANN, N.A.; RHODEN, A.C. Efeito da qualidade fisiológica e da profundidade de semeadura na emergência de sementes de trigo. **Revista de Ciências Agroveterinárias e Alimentos**, v.2, n.2, p.1-17, 2017.

MATILLA, A.J.; CARRILLO-BARRAL, N.; RODRÍGUEZ-GACIO, M.C. An update on the role of NCED and CYP707A ABA metabolism genes in seed dormancy induction and the response to after-ripening and nitrate. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.34, n.2, p.274-293, 2015.

MAZZA, C.A.; BALLARÉ, C.L. Photoreceptors UVR8 and phytochrome B cooperate to optimize plant growth and defense in patchy canopies. **New Phytologist**, v.207, n.2, p.4-9, 2015.

MCKENZIE-GOPSILL, A.G.; LEE, E.; LUKENS, L.; SWANTON, C.J. Rapid and early changes in morphology and gene expression in soya bean seedlings emerging in the presence of neighbouring weeds. **Weed Research**, v.56, n.4, p.267-273, 2016.

MELANDER, B.; MUNIER-JOLAIN, N.; CHARLES, R.; WIRTH, J.; SCHWARZ, J.; VAN DER WEIDE, R.; BONIN, L.; JENSEN, P.K.; KUDSK, P. European perspectives on the adoption of non-chemical weed management in reduced tillage systems for arable crops. **Weed Technology**, v.27, n.1, p.231-240, 2013.

MHAMDI, A.; QUEVAL, G.; CHAOUCH, S.; VANDERAUWERA, S.; BREUSEGEM, F.V.; NOCTOR, G. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, v.61, n.15, p.4197-4220, 2010.

MICHITTE, P.; DE PRADO, R.; ESPINOZA, N.; RUIZ-SANTAELLA, J.P.; GAUVRIT, C. Mechanisms of resistance to glyphosate in a ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. **Weed Science**, v.55, n.5, p.435-441, 2007.

MILLAR, A.A.; JACOBSEN, J.V.; ROSS, J.J.; HELLIWELL, C.A.; POOLE, A.T.; SCOFIELD, G.; REID, J.B.; GUBLER, F. Seed dormancy and ABA metabolism in Arabidopsis and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. **The Plant Journal**, v.45, n.6, p.942-954, 2006.

MIRSKY, S.B.; GALLANDT, E.R.; MORTENSEN, D.A.; CURRAN, W.S.; SHUMWAY, D.L. Reducing the germinable weed seedbank with soil disturbance and cover crops. **Weed Research**, v.50, n.4, p.341-352, 2010.

MITTLER, R. ROS are good. **Trends in Plant Science**, v.22, n.1, p.11-19, 2017.

MOHSENI-MOGHADAM, M.; SCHROEDER, J.; ASHIGH, J. Mechanism of resistance and inheritance in glyphosate resistance palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) populations from New Mexico, USA. **Weed Science**, v.61, n.4, p.517-525, 2013.

MOLIN, W.T.; WRIGHT, A.A.; NANDULA, V.K. Glyphosate-resistant goosegrass from Mississippi. **Agronomy**, v.3, n.5, p.474-487, 2013.

NONOGAKI, M.; NONOGAKI, H. Prevention of preharvest sprouting through hormone engineering and germination recovery by chemical biology. **Frontiers in Plant Science**, v.8, n.90, p.1-7, 2017.

MORAES, P.V.D.; AGOSTINETTO, D.; VIGNOLO, G.K.; SANTOS, L.S.; PANOZZO, L.E. Manejo de plantas de cobertura no controle de plantas daninhas na cultura do milho. **Planta Daninha**, v.27, n.2, p.289-296, 2009.

MORETTI, M.L.; VAN HORN, C.R.; ROBERTSON, R.; SEGOBYE, K.; WELLER, S.C.; YOUNG, B.G.; JOHNSON, W.G.; SAMMONS, D.; WANG, D.; GE, X.; AVIGNON, A.; GAINES, T.A.; WESTRA, P.; GREEN, A.C.; JEFFERY T.; LESPÉRANCE, M.A.; TARDIF, F.J.; SIKKEMA, P.H.; HALL, C.; McLEAN, M.D.; LAWTON, M.B.; SCHULZ, B. Glyphosate resistance in *Ambrosia trifida*: Part 2. Rapid response physiology and non-target-site resistance. **Pest Management Science**, v.74, n.5, p.1079-1088, 2018.

MÜLLER, L.; MANFRON, P.A.; MEDEIROS, S.L.P.; STRECK, N.A.; MITTELMAN, A.; NETO, D.D.; BANDEIRA, A.H.; MORAIS, K.P. Temperatura base inferior e estacionalidade de produção de genótipos diploides e tetraploides de azevém. **Ciência Rural**, v.39 n.5, p.1343-1348, 2009.

MUTZ, K.O.; HEILKENBRINKER, A.; LÖNNE, M.; WALTER, J.G.; STAHL, F. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. **Current Opinion in Biotechnology**, v.24, n.1, p.22-30, 2013.

NAIR, R. Developing tetraploid perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) populations. **New Zealand Journal Agricultural Research**.v.47, n.7, p.45-49, 2004.

NAMBARA, E.; OKAMOTO, M.; TATEMATSU, K.; YANO, R.; SEO, M.; KAMIYA, Y. Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. **Seed Science Research**, v.20, n.2, p.55-67, 2010.

NANDULA, V.K.; REDDY, K.N.; POSTON, D.H.; RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O. Glyphosate-tolerance mechanisms in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) from Mississippi. **Weed Science**, v.56, n.3, p.344-349, 2008.

NARWAL, S.; SINDEL, B.M.; JESSOP, R.S. Dormancy and longevity of annual ryegrass (*Lolium rigidum*) as affected by soil type, depth, rainfall, and duration of burial. **Plant and Soil**, v.310, n.9, p.225-234, 2008.

NÉE, G.; XIANG, Y.; SOPPE, W.J.J. The release of dormancy, a wake-up call for seeds to germinate. **Current Opinion in Plant Biology**, v.35, n.2, p.8-14, 2017.

NICOT, N.; HAUSMAN, J.F.; HOFFMANN, L.; EVERS, D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress **Journal of Experimental Botany**, v.56, n.421, p.2907-2914, 2005.

NOL, N.; TSIKOU, D.; EID, M.; LIVIERATOS, I.C.; GIANNOPOLITIS, C.N. 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, n.3, p.233-241, 2012.

NORRIS, R.F. Weed fecundity: Current status and future needs. **Crop Protection**, v.26, n.3, p.182-188, 2007.

NORSWORTHY, J.K.; WARD, S.M.; SHAW, D.R.; LLEWELLYN, R.S.; NICHOLS, R.L.; WEBSTER, T.M.; BRADLEY, K.W.; FRISVOLD, G.; POWLES, S.B; BURGOS, N.R.; WITT, W.W.; BARRETT, M. Reducing the risks of herbicide resistance: Best management practices and recommendations. **Weed Science**, v.60, n.1, p.31-62, 2012.

O'DONOVAN, M.; DELABY, L. A comparison of perennial ryegrass cultivars differing in heading date and grass ploidy with spring calving dairy cows grazed at two different stocking rates. **Animal Research**, v.54, n.5, p.337-350, 2005.

OLIVEIRA, L.V.; FERREIRA, O.G.L.; COELHO, R.A.T.; FARIAS, P.P.; SILVEIRA, R.F. Características produtivas e morfofisiológicas de cultivares de azevém. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.44, n.2, p.191-197, 2014.

ORR, H.A. Fitness and its role in evolutionary genetics. **Nature Reviews Genetics**, v.10, n.8, p.531-539, 2009.

PADGETTE, S.R.; KOLACZ, K.H.; DELANNAY, X.; RE, D.B.; LaVALLE, B.J.; TINIUS, C.N.; RHODES, W.K.; OTERO, Y.I.; BARRY, G.F.; EICHHOLTZ, D.A.; PESCHKE, V.M.; NIDA, D.L.; TAYLORAND, D.L.; KISHORE, G.M. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop Science**, v.35, n.5, p.1451-1461, 1995.

PADMANABHAN, K.P.; SEGOBYE, K.; WELLER, S.C.; SCHULZ, B.; GRIBSKOV, M. Preliminary investigation of glyphosate resistance mechanism in giant ragweed using transcriptome analysis. **F1000Research**, v.5, n.6, p.1354-1364, 2016.

PAGE, E.R. Shade avoidance: an integral component of crop–weed competition. **Weed Research**, v.50, n.4, p.281-288, 2010.

PALLETT, K.E.; LITTLE, J.P.; VEERASEKARAN, P.; VIVIANI, F. Inhibition of 4-hydroxyphenol pyruvate dioxygenase: the mode of action of the herbicide RPA 201772 (isoxaflutole). **Pest Management Science**. v.50, n.1, p.83-84, 1997.

PAN, X.; WELTI, R.; WANG, X. Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Phytochemistry**, v.69, n.5, p.1773-1781, 2008.

PASSINI, T.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; YADA, I.F.U. Competitividade do feijoeiro-comum com o capim-marmelada [*Brachiaria plantaginea* (link) hitch.]. **Scientia Agricola**, v.60, n.2, p.259-268, 2003.

PAULA, J.M.; AGOSTINETTO, D.; SCHAEGLER, C.E.; VARGAS, L.; SILVA, D.R.O. Competição de trigo com azevém em função de épocas de aplicação e doses de nitrogênio. **Planta Daninha**, v.29, n.3, p.557-563, 2011.

PEDROSO, C.E.S.; MEDEIROS, R.B.; SILVA, M.A.; JORNADA, J.B.J.; SAIBRO, J.C.; TEIXEIRA, J.R.F. Comportamento de ovinos em gestação e lactação sob pastejo em diferentes estágios fenológicos de azevém anual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.5, p.1340-1344, 2004.

- PEIXOTO, P.H.P; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.3, p.137-143, 1999.
- PENG, Y.; ABERCROMBIE, L.L.G.; YUAN, J.S.; RINGGINS, C.W.; SAMMONS, R.D.; TRANEL, P.J.; STEWART JR, C.N. Characterization of the horseweed (*Conyza canadensis*) transcriptome using GS-FLX 454 pyrosequencing and its application for expression analysis of candidate non-target herbicide resistance genes. **Pest Management Science**, v.66, n.10, p.1053-1062, 2010.
- PERBONI, L.T.; AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L.; CECHIN, J.; ZANDONÁ, R.R.; FARIAS, H.S. Yield, germination and herbicide residue in seeds of preharvest desiccated wheat. **Journal of Seed Science**, v.40, n.3, p.304-312, 2018.
- PEREIRA, L.V.; CARVALHO, L.B.; DAL MAGRO, T. Chemical control of *Lolium multiflorum*: effect of biotype and time of spraying. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.16, n.3, p.338-341, 2017.
- PEREZ-JONES, A.; PARK, K-W.; POLGE, N.; COLQUHOUN, J.; MALLORY-SMITH, C.A. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. **Planta**, v.226, n.2, p.395-404, 2007.
- PEREZ-ORTEGA, P.; GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCIA-REYES, J.F.; RAMOS-MARTOS, N.; MOLINA-DÍAZ, A. Generic sample treatment method for simultaneous determination of multiclass pesticides and mycotoxins in wines by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1249, n.8, p.32-40, 2012.
- PETERSEN, T.N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v.8, n.10, p.785-786, 2011.
- PFÄFFL, M.V.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T.P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v.26, n.6, p.509-515, 2004.
- PIASECKI, C.; MAZON, A.S.; MONGE, A.; CAVALCANTE, J.A.; AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. Glyphosate applied at the early reproductive stage inviabilizes the production of seeds of glyphosate-resistant hairy fleabane. **Planta Daninha**, v.37, no prelo, 2019.
- POWLES, S.B.; PRESTON, C. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. **Weed Technology**, v.20, n.2, p.282-289, 2006.
- POWLES, S.B.; YU, Q. Evolution in action: Plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, n.61, n.4, p.317-347, 2010.

PRESTON, C.; WAKELIN, A.M.; DOLMAN, F.C.; BOSTAMAM, Y.; BOUTSALIS, P. A decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the world: mechanisms, genes, fitness, and agronomic management. **Weed Science**, v.57, n.4, p.435-441, 2009.

PRICE, J.N.; WRIGHT, B.R.; GROSS, C.L.; WHALLEY, W.R.D.B. Comparison of seedling emergence and seed extraction techniques for estimating the composition of soil seed banks. **Methods in Ecology and Evolution**, v.1, n.2, p.151-157, 2010.

PRIESTMAN, M.A.; FUNKE, T.; SINGH, I.M.; CRUPPER, S.S. SCHÖNBRUNN, E. 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Staphylococcus aureus* is insensitive to glyphosate. **FEBS Letters**, v.579, n.3, p.728-732, 2005.

PUNTA, M.; COGGILL, P.C.; EBERHARDT, R.Y.; MISTRY, J.; TATE, J.; BOURSNEILL, C.; PANG, N.; FORSLUND, K.; CERIX, G.; CLEMENTS, J.; HEGER, A.; HOLM, L.; SONNHAMMER, E.L.L.; EDDY, S.R.; BATEMAN, A.; FINN, R.D. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, v.40, n.1, p.290-301, 2012.

RADOSEVICH, S.R.; HOLT, J.; GHERSA, C. **Ecology of Weeds and Invasive Plants: Relationship to agriculture and natural resource management**. 3ed. John Wiley & Sons, 2007. 454p.

RADWAN, D.E.M.; FAYEZ, K.A. Photosynthesis, antioxidant status and gas-exchange are altered by glyphosate application in peanut leaves. **Photosynthetica**, v.54, n.2, p.307-316, 2016.

RAMSKOLD, D.; KAVAK, E.; SANDBERG, R. How to analyze gene expression using RNA-sequencing data. **Next Generation Microarray Bioinformatics**, v.802, n.11, p.259-274, 2012.

RANNEY, T.G. Polyploidy: From evolution to new plant development. **CPIPPS**, v.56, n.1, p.137-142, 2006.

RASMUSSEN, R. **Quantification on the LightCycler**. In: MEUER, S.; WITTWER, C.; NAKAGAWARA, K.I. Rapid Cycle Real-Time PCR. Berlin: Heidelberg. 2001. p.21-34.

REDDY, K.N.; RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O.; NANDULA, V.K. Aminomethylphosphonic acid accumulation in plant species treated with glyphosate. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.6, p.2125-2130, 2008.

REIS, G.G.; MULLER, M.W. **Análise de crescimento de plantas - mensuração do crescimento**. Belém: CPATU. 1978. 35p.

RENTON, M.; FLOWER, K.C. Occasional mouldboard ploughing slows evolution of resistance and reduces long term weed populations in no-till systems. **Agricultural Systems**, v.139, n.10, p.66-75, 2015.

RIGOLI, R. P.; AGOSTINETTO, D.; SCHAEGLER, C.E.; DAL MAGRO, T.; TIRONI, S.P. Habilidade competitiva relativa do trigo (*Triticum aestivum*) em convivência com azevém (*Lolium multiflorum*) ou nabo (*Raphanus raphanistrum*). **Planta Daninha**, v.26, n.1, p.93-100, 2008.

RIGOLI, R.P.; AGOSTINETTO, D.; VAZ DA SILVA, J.M.B.; FONTANA, L.C.; VARGAS, L. Potencial competitivo de cultivares de trigo em função do tempo de emergência. **Planta Daninha**, v.27, n.1, p.41-47, 2009.

ROBINSON, M.D.; MCCARTHY, D.J.; SMYTH, G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v.26, n.1, p.139-140, 2010.

ROMAN, E.S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M.A.; MATTEI, R.W. Resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v.22, n.2, p.301-306, 2004.

SAINI, R.K.; KLEEMANN, S.G.L.; PRESTON, C.; GILL, G.S. Control of clethodim-resistant *Lolium rigidum* (rigid ryegrass) in triazine-tolerant canola (*Brassica napus* L.) in southern Australia. **Crop Protection**, v.78, n.12, p.99-105, 2014.

SALAS, R.A.; DAYAN, F.E.; PAN, Z.; WATSON, S.B.; DICKSON, J.W.; SCOTT, R.C.; BURGOS, N.R. EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* spp. *multiflorum*) populations from Arkansas. **Pest Management Science**, v.68, n.9, p.1223-1230, 2012.

SALAS, R.A.; SCOTT, R.C.; DAYAN, F.E.; BURGOS, N.R. EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) from Arkansas (USA). **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.63, n.25, p.5885-5893, 2015.

SALAS-PEREZ, R.A.; SASKI, C.A.; NOORAI, E.E.; SRIVASTAVA, S.K.; LAWTON-RAUH, A.L.; NICHOLS, R.L.; BURGOS, N.R. RNA-Seq transcriptome analysis of *Amaranthus palmeri* with differential tolerance to glufosinate herbicide. **PlosOne**, v.13, n.4, p.1-33, 2018.

SAMMONS, R.D.; GAINES, T.A. Glyphosate resistance: state of knowledge. **Pest Management Science**, v.70, n.9, p.1367-1377, 2014.

SBCS – Sociedade Brasileira de Ciência do solo – Núcleo Regional Sul. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 2ed. Santa Maria: Palotti. 2016. 375p.

SCHERNER, A.; MELANDER, B.; KUDSK, P. Vertical distribution and composition of weed seeds within the plough layer after eleven years of contrasting crop rotation and tillage schemes. **Soil and Tillage Research**, v.161, n.8, p.135-142, 2016.

SCOTT, H.D.; BATCHELOR, J.T. Dry weight and leaf area production rates of irrigated determinate soybeans. **Agronomy Journal**, v.71, n.5, p.776-782, 1979.

SEEFELDT, S.S.; JENSEN, J.E.; FUERST, E.P. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. **Weed Technology**, v.9, n.2, p.218-225, 1995.

SENSEMAN, S.A. (Ed.). **Herbicide handbook**. 9ed. Lawrence: Weed Science Society of America, 2007. 458p.

SERRA, A.A.; NUTTENS A, LARVOR V, RENAULT D, COUÉE I, SULMON C, GOUESBET G. Low environmentally relevant levels of bioactive xenobiotics and associated degradation products cause cryptic perturbations of metabolism and molecular stress responses in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v.64, n.10, p.2753-2766, 2013.

SHANER, D.L.; BECKIE, H.J. The future for weed control and technology. **Pest Management Science**, v.70, n.9, p.1329-1339, 2014.

SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v.2012, n.2, p.1-26, 2012.

SIGMAPLOT - **Scientific Graphing Software**. Version 12.0, 2012.

SILVA, P.R.F.; ARGENTA, G.; SANGOI, L.; STRIEDER, M.L.; SILVA, A.A. Estratégias de manejo de coberturas de solo no inverno para cultivo do milho em sucessão no sistema semeadura direta. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.1011-1020, 2006.

SILVER, N.; BEST, S.; JIANG, J.; THEIN, S.L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v.7, n.33, p.1-9, 2006.

SINGH, B.K.; SHANER, D.L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, v.12, n.3, p.527-530, 1998.

STEADMAN, K.J.; EATON, D.M.; PLUMMER, J.A; FERRIS, D.G; POWLES, S.B. Late-season non-selective herbicide application reduces *Lolium rigidum* seed number, seed viability, and seedling fitness. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.57, n.1, p.133-141, 2005.

STORCK, L.; LOPES, S.J.; LÚCIO, A.D. **Introdução à Experimentação**. Santa Maria: Departamento de Fitotecnia/UFSM, 2001. 54p.

SUDHAKAR, C.; LAKSHMI, A.; GIRIDARAKUMAR, S. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. **Plant Science**, v.161, n.3, p.613-619, 2001.

SWANTON, C.J.; BOOTH, B.D. Management of weed seedbanks in the context of populations and communities. **Weed Technology**, v.18, n.1, p.1496-1502, 2004.

SWANTON, C.J.; NKOA, R.; BLACKSHAW, R.E. Experimental methods for crop-weed competition studies. **Weed Science**, v.63, n.1, p.2-12, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954p.

TANETANI, Y.; KAKU, K.; KAWAI, K.; FUJIOKA, T.; SHIMIZU, T.; Action mechanism of a novel herbicide, pyroxasulfone. **Pesticide Biochemistry and Physiology** v.95, n.1, p.47-55, 2009.

TEASDALE, J.R.; MANGUM, R.W.; RADHAKRISHNAN, J.; CAVIGELLI, M.A. Weed seedbank dynamics in three organic farming crop rotations. **Agronomy Journal**, v.96, n.5, p.1429-1435, 2004.

TIRONI, S.P.; GALON, L.; SILVA, A.F.; FIALHO, C.M.T.; ROCHA, P.R.R.; FARIA, A.T.; ASPIAZÚ, I.; FORTE C.T.; SILVA, A.A.; RADÜNZ, A.L. Época de emergência de azevém e nabo sobre a habilidade competitiva da cultura da cevada. **Ciência Rural**, v.44, n.9, p.1527-1533, 2014.

TONETTO C.J.; MÜLLER, L.; MEDEIROS, S.L.P.; MANFRON, P.A.; BANDEIRA A.H.; MORAIS, K.P.; LEAL L.T.; MILTTEMANN, A.; NETO, D.D. Produção e composição bromatológica de genótipos diploides e tetraploides de azevém. **Zootecnia Tropical**, v.29, n.2, p.169-178, 2011.

TZIN, V.; GALILI, G. New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. **Molecular Plant**, v.3, n.6, p.956-972, 2010.

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B.C.; REMM, M.; ROZEN, S.G. Primer3--new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v.40, n.15, p.1-12, 2012.

VARGAS, A.A.M.; AGOSTINETTO, D.; ZANDONÁ, R.R.; FRAGA, D.S.; AVILA NETO, R.C. Longevity of horseweed seed bank depending on the burial depth. **Planta Daninha**, v.36, n.3, p.1-8, 2018.

VARGAS, L., ADEGAS, F., GAZZIERO, D., KARAM, D., AGOSTINETTO, D., SILVA, W.T. Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil: Histórico, distribuição, impacto econômico, manejo e prevenção. In: MASCHAEDE, K., GAZZIERO, D.P. (Eds.). **A Era Glyphosate: Agricultura, meio ambiente e homem**. 1ed. Londrina: Midiograf, 2016. p.219-240.

VARGAS, L.; FRAGA, D.S.; AGOSTINETTO, D.; MARIANI, F.; DUARTE, T.V.; SILVA, B.M. Dose-response curves of *Lolium multiflorum* biotypes Resistant and susceptible to clethodim. **Planta Daninha**, v.31, n.4, p.887-892, 2013.

VARGAS, L.; NOHATTO, M.A.; AGOSTINETTO, D.; BIANCHI, M.A.; GONÇALVESM E.M.; TOLEDO, R.E. Resposta de biótipos de *Euphorbia heterophylla* a doses de glyphosate. **Planta Daninha**, v.29, n.spe, p.1121-1128, 2011.

VARGAS, L.; ROMAN, E.S. Seletividade e eficiência de herbicidas em cereais de inverno. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.4, n.3, p.1-10, 2005.

- VARGAS, L.; ROMAN, E.S.; RIZZARDI, M.A.; SILVA, V.C. Alteração das características biológicas dos biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) ocasionada pela resistência ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v.23, n.1, p.153-160, 2005.
- VEMANNA, R.S.; VENNAPUSA, A.R.; EASWARAN, M.; CHANDRASHEKAR, B.K.; RAO, H.; GHANTI, K.; SUDHAKAR, C.; MYSORE, K.S.; MAKARLA, U. Aldo-keto reductase enzymes detoxify glyphosate and improve herbicide resistance in plants. **Plant Biotechnology Journal**, v.15, n.7, p.794-804, 2017.
- VIDAL, R.A.; TREZZI, M.M. Análise de crescimento de biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes e suscetível aos herbicidas inibidores da ALS. **Planta Daninha**, v.18, n.3, p.427-433, 2000.
- VILA- AIUB, M.M.; NEVE, P.; POWLES, S.B. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. **New Phytologist**. v.184, n.4, p.751-767, 2009.
- VILA-AIUB, M.M.; GUNDEL, P.E.; PRESTON, C. Experimental methods for estimation of plant fitness costs associated with herbicide-resistance genes. **Weed Science**, v.63, n.1, p.203-217, 2015.
- VIVIAN, R.; GOMES JR., F.G.; CHAMMA, H.M.C.P.; SILVA, A.A.; FAGAN, E.B.; RUIZ, S.T. Efeito da luz e da temperatura na germinação de *Alternanthera tenella*, *Conyza bonariensis* e *Digitaria ciliaris*. **Planta Daninha**, v.26, n.3, p.507-513, 2008.
- WALSH, M.J.; FOWLER, T.M.; CROWE, B.; AMBE, T.; POWLES, S.B. The potential for pyroxasulfone to selectively control resistant and susceptible Rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) biotypes in Australian grain crop production systems. **Weed Technology**, v.25, n.1, p.30-37, 2011.
- WALSH, M.J.; POWLES, S.B. Management strategies for herbicide-resistant weed populations in Australian dryland crop production systems. **Weed Technology**, v.21, n.2, p.332-338, 2007.
- WAN, H.; ZHAO, Z.; QIAN, C.; SUI, Y.; MALIK, A.A.; CHEN, J. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. **Analytical Biochemistry**, v.399, n.2, p.257-261, 2010.
- WANG, G.; MCGIFFIN, M.E.; J.R.; EHLERS, J.D. Competition and growth of six cowpea (*Vigna unguiculata*) genotypes, sunflower (*Helianthus annuus*), and common purslane (*Portulaca oleracea*). **Weed Science**, v.54, n.6, p.954-960, 2006.
- WERCK-REICHHART, D.; HEHN, A.; DIDIERJEAN, L. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. **Trends in Plant Science**, v.5, n.3, p.116-123, 2000.
- WEST, C.; BRIGGS, G.E.; KIDD, F. Methodos and significant relations in the quantitative analysis of planta growth. **New Physiologist**, v.19, n.7, p.200-207, 1920.

WESTRA, E.P.; SHANER, D.L.; BARBARICK, K.A.; KHOSLA, R. Evaluation of sorption coefficients for pyroxasulfone, s-metolachlor, and dimethenamid-p. **Air, Soil and Water Research**, v.8, n.3, p.9-15, 2015.

WIERSMA, A.T.; GAINES, T.A.; PRESTON, C.; HAMILTON, J.P.; GIACOMINI, D.; ROBIN-BUELL, C.; LEACH, J.E.; WESTRA, P. Gene amplification of 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase in glyphosate-resistant *Kochia scoparia*. **Planta**, v.241, n.2, p.463-474, 2015.

WINGET, S.W.; ANDREWS, S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. **F1000Research**, v.7, n.1338, p.1-13, 2018.

XU, Y.H.; LIU, R.; YAN, L.; LIU, Z.Q.; JIANG, S.C.; SHEN, Y.Y.; WANG, X.F.; ZHANG, D.P. Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins are required for stomatal response to abscisic acid in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, v.63, n.3, p.1095-1106, 2012.

YAMASHITA O.M.; GUIMARÃES, S.C.; ALBUQUERQUE, M.C.F; CARVALHO, M.A.C.; MASSAROTO, J.A.; KOGA, P.S.; CAMPOS, O.R. Germinação de sementes de duas espécies de *Conyza* em função da presença ou ausência de luz e interação com a adição de nitrato e ácido giberélico no substrato. **Ambiência**, v.12, n.2, p.655-666, 2016.

YAMASHITA, O.M.; GUIMARÃES, S.C. Germinação das sementes de *Conyza canadensis* e *Conyza bonariensis* em função da disponibilidade hídrica no substrato. **Planta Daninha**, v.28, n.2, p.309-317, 2010.

YAN, D.; EASWARAN, V.; CHAU, V.; OKAMOTO, M.; IERULLO, M.; KIMURA, M.; ENDO, A.; YANO, R.; PASHA, A.; GONG, Y.; BI, Y.M.; GUTTMAN, D.; KRAPP, A.; ROTHSTEIN, S.J.; NAMBARA, E. NIN-like protein 8 is a master regulator of nitrate-promoted seed germination in *Arabidopsis*. **Nature Communications**, v.7, n.9, p.1-11, 2016.

YANNICCARI, M.; ISTILART, C.; GIMÉNEZA, D.O.; CASTRO, A.M. Effects of glyphosate on the movement of assimilates of two *Lolium perenne* L. populations with differential herbicide sensitivity. **Environmental Experimental Botany**, v.82, n.10, p.14-19, 2012a.

YANNICCARI, M.; ISTILART, C.; GIMÉNEZ, D.O.; CASTRO, A.M. Glyphosate resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) from Argentina. **Crop Protection**, v.32, n.2, p.12-16, 2012b.

YU, Q.; JALALUDIN, A.; HAN, H.; CHEN, M.; SAMMONS, D.; POWLES, S.B. 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, n.4, p.1440-1447, 2015.

YU, Q.; POWLES, S.B. Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: A threat to herbicide sustainability and global crop production. **Plant Physiology**, v.166, n.3, p.1106-1118, 2014.

YU, Q.; HAN, H.; NGUYEN L.; FORSTER, J.W.; POWLES, S.B. Paraquat resistance in a *Lolium rigidum* population is governed by one major nuclear gene. **Theoretical & Applied Genetics**, v.118, n.8, p.1601-1608, 2009.

YUAN, J.S.; ABERCROMBIE, L.L.G.; CAO, Y.; HALFHILL, M.D.; ZHOU, X.; PENG, Y.; HU, J.; RAO, R.R.; HECK, G.R.; LAROSA, T.J.; SAMMONS, D.; WANG, X.; RANJAN, P.; JOHNSON, D.H.; WADL, P.A.; SCHEFFLER, B.E.; RINEHART, T.A.; TRIGIANO, R.N.; STEWART JR, C.N. Functional genomics analysis of horseweed (*Conyza canadensis*) with special reference to the evolution of non-target-site glyphosate resistance. **Weed Science**, v.58, n.2, p109-117, 2010.

YUAN, J.S.; TRANEL, P.J.; STEWART JR, C.N. Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends in Plant Science**, v.12, n.1, p.6-13, 2007.

ZABALZA, A.; ORCARAY, L.; FERNANDEZ-ESCALADA, M.; ZULETGONZALEZ, A.; ROYUELA, M. The pattern of shikimate pathway and phenylpropanoids after inhibition by glyphosate or quinate feeding in pea roots. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.141, n.11, p.96-102, 2017.

ZHANG, Z.; HU, J. Development and validation of endogenous reference genes for expression profiling of Medaka (*Oryzias latipes*) exposed to endocrine disrupting chemicals by quantitative real-time RT-PCR. **Toxicological Sciences**, v.95, n.2, p.356-368, 2009.

VITA

Joanei Cechin é filho de João Batista Cechin e Neuza Maria Fontana Cechin. Nasceu em 03 de abril de 1985, no Município de Santa Maria, Rio Grande do Sul. No ano de 1992, iniciou os estudos no Colégio Municipal José Santo Figuera concluindo o ensino fundamental na Escola Estadual Integrada de 1º Grau Arroio Grande em Santa Maria/RS no ano de 1999. Neste período, foi agraciado como um dos cinco melhores alunos da Escola com reconhecimento concedido no ano de 1995. Em 2000, iniciou os estudos na Escola Estadual de Educação Básica Bom Conselho em Silveira Martins/RS onde se formou no ano de 2002. No ano de 2003, ingressou no curso de Técnico Agrícola habilitação em Agropecuária pelo Colégio Agrícola de Santa Maria da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), onde graduou Técnico Agrícola habilitação Agropecuária em 2005. No ano de 2007, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria onde colou grau no ano de 2012. Durante período de 2008 a 2012, foi bolsista de iniciação científica (PRAE/UFSM e PIBIC/CNPq) onde colaborou e desenvolveu atividades de pesquisa sobre propagação *in vitro* e *ex vitro* de espécies vegetais e manejo de plantas daninhas nas culturas da soja, arroz, milho e cereais de inverno. Em 2013, ingressou e obteve grau de Mestre em Fitossanidade pelo Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas localizada no município do Capão do Leão/RS, onde trabalhou com resistência de nabo a herbicidas inibidores da enzima ALS. Em 2015, iniciou o doutorado pela mesma instituição, onde desenvolveu trabalhos relacionados a análise de transcriptoma e práticas de manejo para redução do banco de sementes do solo de biótipos de azevém resistente ao glifosato.