

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

FORTUNATO DE BORTOLI PAGNONCELLI JUNIOR

**RESISTÊNCIA AO GLYPHOSATE EM POPULAÇÕES DE  
AZEVÉM: ESTUDO DE ASPECTOS MOLECULARES E DA  
DINÂMICA POPULACIONAL SUPORTANDO MODELOS  
PREDITIVOS PARA CONTROLE**

TESE

PATO BRANCO

2020

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

FORTUNATO DE BORTOLI PAGNONCELLI JUNIOR

**RESISTÊNCIA AO GLYPHOSATE EM POPULAÇÕES DE  
AZEVÉM: ESTUDO DE ASPECTOS MOLECULARES E DA  
DINÂMICA POPULACIONAL SUPORTANDO MODELOS  
PREDITIVOS PARA CONTROLE**

TESE

PATO BRANCO

2020

FORTUNATO DE BORTOLI PAGNONCELLI JUNIOR

**RESISTÊNCIA AO GLYPHOSATE EM POPULAÇÕES DE  
AZEVÉM: ESTUDO DE ASPECTOS MOLECULARES E DA  
DINÂMICA POPULACIONAL SUPORTANDO MODELOS  
PREDITIVOS PARA CONTROLE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Michelangelo Muzell Trezzi

Co-Orientador: Dr. Jose Luis González-Andújar

PATO BRANCO

2020

P139r Pagnoncelli Junior, Fortunato De Bortoli.

Resistência ao glyphosa em populações de azevém: estudo de aspectos moleculares e da dinâmica populacional suportando modelos preditivos para controle / Fortunato De Bortoli Pagnoncelli Junior. -- 2020.  
125 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Michelangelo Müzzel Trezzi

Coorientador: Prof. Dr. Jose Luis González-Andújar

Tese (Doutorado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR, 2020.

Inclui bibliografia

1. Azevem. 2. Plantas - Efeito dos herbicidas. 3. Plantas daninhas - Controle. 4. Climatologia agrícola. I. Trezzi, Michalangelo Müzzel, orient. II. González-Andújar, Jose Luis, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD (22. ed.) 630

Ficha Catalográfica elaborada por  
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630  
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



Ministério da Educação

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Câmpus Pato Branco

Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Programa de Pós-Graduação em Agronomia



---

## TERMO DE APROVAÇÃO DE TESE Nº 67

A Tese de Doutorado intitulada “Resistência ao *glyphosate* em populações de azevém: estudo de aspectos moleculares e da dinâmica populacional suportando modelos preditivos para controle” defendida em sessão pública pelo candidato **Fortunato De Bortoli Pagnoncelli Junior**, no dia 03 de agosto de 2020, foi julgada para a obtenção do título de Doutor em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, linha de pesquisa Proteção de Plantas e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Mauro Antonio Rizzardi - UPF/ Passo Fundo
Dr. Cleber Daniel de Goes Maciel - UNICENTRO/ Guarapuava
Dr. Anderson Luis Nunes - IFRS/Sertão
Dr. Gilberto Santos Andrade - UTFPR/Pato Branco
Dr. Michelangelo Muzell Trezzi - UTFPR/Pato Branco

Este Termo de Aprovação encontra-se na pasta do aluno na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação realizada após a entrega da versão final, incluindo correções necessárias, permitindo o encaminhamento para análise e publicação no Repositório Institucional.

Assinado eletronicamente por

PROF. DR. ALCIR JOSÉ MODELO

Coordenador do Programa de Pós-graduação em Agronomia

## **DEDICO**

Ao meu pai Fortunato Rizzon Pagnoncelli  
A minha mãe Salete Leonilda De Bortoli Pagnoncelli  
Ao meu irmão Giovani De Bortoli Pagnoncelli

## AGRADECIMENTOS

A minha família, meus pais Fortunato e Salete, pelo amor, carinho, dedicação e apoio para a minha formação.

Ao meu orientador professor Michelangelo M. Trezzi, pelo apoio, confiança, respeito e amizade. Seus ensinamentos ao longo da estadia na UTFPR - o qual foram mais de 10 anos de convivência, desde o início da graduação - que em muito contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

Ao meu coorientador, Dr. Jose L. González-Andújar pelo acolhimento em seu laboratório no IAS/CSIC, pela confiança, apoio, amizade, respeito e dedicação. Apesar do nosso curto período de convívio, seus ensinamentos foram além da ciência.

Aos pesquisadores Francisco B. Losada e Maria José Giménez e as estudantes Suzana León e Maria H. Guzmán do laboratório de Biologia molecular e Melhoramento vegetal do IAS/CSIC, pelo acolhimento no laboratório, auxílio nas análises e ensinamentos repassados.

As colegas Verónica P. Jiménez, María Eva H. Plaza e Alicia Rougue do laboratório de agroecologia de plantas daninhas do IAS/CSIC pela amizade.

Aos amigos(as) do grupo NIPED, Matheus Vieceli, Victor Bohn, Eduardo Rozin e Patricia P. Bortolanza pela amizade e convivência, em especial a Helis Marina e Katia Hartmann, pela amizade, convívio e apoio na condução dos experimentos.

A todos os meus amigos, pela amizade, apoio e companheirismo em todos os momentos.

Aos professores Mauro Rizzardi, Anderson L. Nunes, Cleber Maciel e Gilberto Andrade pela participação da banca examinadora.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Aos membros do IAS/CSIC e colegas, pelo recebimento, suporte e oportunidade para o desenvolvimento do trabalho no instituto.

A todos os professores da UTFPR que em muito contribuíram para minha formação.

A todos os servidores da UTFPR, em especial ao Sr. Otavio e Itacir, pela amizade e ajuda para o desenvolvimento dos experimentos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

Enfim, a todos que mesmo não citados, de alguma forma contribuíram com este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

"Here's to the crazy ones, the misfits, the rebels, the troublemakers, the round pegs in the square holes ... the ones who see things differently -- they're not fond of rules, and they have no respect for the status quo. ... You can quote them, disagree with them, glorify or vilify them, but the only thing you can't do is ignore them because they change things. ... They push the human race forward, and while some may see them as the crazy ones, we see genius, because the people who are crazy enough to think that they can change the world, are the ones who do." - **Steve Jobs**

## RESUMO

PAGNONCELLI, Fortunato De Bortoli. Resistência ao glyphosate em populações de Azevém: estudo de aspectos moleculares e da dinâmica populacional suportando modelos preditivos para controle. 125 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2020.

Azevém (*Lolium spp.*) é uma espécie infestante amplamente disseminada em áreas de lavoura em todo o mundo. Devido à rusticidade e alta taxa de crescimento, essa espécie é amplamente cultivada, tanto para a cobertura de solo quanto para produção de forragem. O uso intensivo de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação resultou na seleção de populações de azevém resistentes, principalmente ao glyphosate. Os objetivos da tese foram: 1) Caracterizar a resposta ao glyphosate e determinar o fator resistência em populações de azevém coletados nas Regiões Sul e Sudoeste Paranaense. 2) Estudar o envolvimento do mecanismo relacionado ao local de ação na resistência ao glyphosate em populações de azevém. 3) Obter informações sobre a demografia de azevém, em populações suscetível e resistente ao glyphosate. 4) Desenvolver e validar um modelo empírico para descrever a emergência de azevém com base no acúmulo térmico do solo. 5) Desenvolver um modelo *cohort*-estocástico de dinâmica populacional de azevém em populações suscetível e resistente ao glyphosate e simular estratégias de manejo para a espécie sob o efeito de dois cenários climáticos. Diversos experimentos foram desenvolvidos em casa de vegetação, laboratório e a campo pertencentes a UTFPR, Campus Pato Branco, Brasil e IAS/CSIC, Espanha. Em áreas de lavoura das regiões Sul e Sudoeste do Paraná, foram coletadas amostras de sementes de 44 populações de azevém e submetidas a ensaios de resposta a doses do herbicida glyphosate. Em populações resistentes (MR20AR, VT05AR e RN02AR) e suscetíveis (MR05AS, VT07AS e RN01AS) ao glyphosate foi estudado o mecanismo de resistência relacionado ao local de ação. Para o estudo de demografia, nas populações resistentes e suscetíveis, foram avaliados os parâmetros emergência, sobrevivência de diferentes *cohorts* de plantas e potencial de produção de sementes. Modelo baseado no acúmulo térmico para

descrever a emergência de azevém foi desenvolvido e validado. Foi desenvolvido um modelo de dinâmica de populações para as populações suscetível e resistente ao glyphosate. Há elevada variabilidade de resposta das populações de azevém ao glyphosate, com fator resistência variando entre 1,37 e 5,5. Em duas (MR20AR e RN02AR) das três populações resistentes estudadas, foi detectado o aumento do número de cópias do gene da EPSPs (11 a 57x). Em relação à demografia, as plântulas apresentaram rápida taxa de emergência ( $\approx 30$  dias) sob condições favoráveis, com sobrevivência de acordo com os *cohorts* de plantas (média de 2 a 10%), e produção de sementes fortemente regulada pela densidade de plantas (90% com 50 pl m<sup>-2</sup>). As populações resistentes (13830 s pl<sup>-1</sup>) diferiram das suscetíveis (20300 s pl<sup>-1</sup>) apenas quanto ao potencial de produção de sementes em baixa densidade. O modelo baseado no acúmulo térmico no solo se mostrou eficiente em descrever a emergência de plântulas da espécie, sendo necessário 390 TT para o início da emergência e 590 TT para atingir 90% de emergência. O modelo de dinâmica de populações demonstrou que o banco de sementes das populações suscetível e resistente tende a se estabilizar em patamares semelhantes ( $\approx 20000$  s m<sup>-2</sup>) e que o incremento médio de temperatura de 2,5°C resultou em aumento do número de sementes presentes no banco ( $\approx 25000$  s m<sup>-2</sup>). As estratégias de interferência química das plantas ou a rotação de cultura com trigo/soja ou aveia/milho demonstraram alta eficiência e foram capazes de suprimir o banco de sementes em mais de 75%. Conclui-se que a amplificação gênica é um mecanismo relacionado com a resistência de plantas de azevém ao glyphosate na Região Sul do Brasil. Os modelos preditivos desenvolvidos na presente tese fornecem uma melhor compreensão do desenvolvimento populacional de azevém assim como modelo termal poderá ser utilizado como ferramenta para auxiliar no manejo da espécie.

**Palavras chave:** Azevém, resistência a herbicidas, mecanismo de resistência, manejo de plantas daninhas, tempo termal, *cohorts*

## ABSTRACT

PAGNONCELLI, Fortunato De Bortoli. Glyphosate resistance in Ryegrass populations: Study of molecular aspects and population dynamics supporting predictive models for control. 125 f. Thesis (Ph.D. in Agronomy) – Graduate Program in Agronomy (Concentration Area: Crop), Federal University of Technology Paraná. Pato Branco, 2020.

Ryegrass (*Lolium* spp.) is a weed widely spread in farming areas around the world. Due to its rusticity and high growth rate, this species is widely cultivated, both for soil cover and forage production. The intensive use of herbicides with the same mechanism has led to the selection of herbicide-resistant Italian ryegrass populations, especially to glyphosate. The objectives of this thesis were: 1) Characterize the response to glyphosate and assess the resistance index in Italian ryegrass populations collected in the South and Southwest Regions of Paraná State. 2) Study the involvement of a target site mechanism resistance to glyphosate in Italian ryegrass populations. 3) Get information on the demography of Italian ryegrass populations, susceptible and resistant to glyphosate. 4) Develop and validate an empirical model to describe Italian ryegrass emergence based on soil thermal accumulation. 5) Develop a *cohort*-stochastic model of Italian ryegrass population dynamics in susceptible and glyphosate resistant populations and simulate management strategies for this species under the effect of two climate scenarios. Several experiments have been developed in the greenhouse, laboratory and field of UTFPR, Campus Pato Branco, Brazil and IAS/CSIC, Córdoba, Spain. In farming areas in the South and Southwest Regions of Paraná State, seeds samples from 44 Italian ryegrass populations were collected and tested for glyphosate response. In resistant (MR20AR, VT05AR and RN02AR) and susceptible (MR05AS, VT07AS and RN01AS) populations to glyphosate, the target site mechanism herbicide resistance was investigated. For the demography study, in resistant and susceptible populations, the parameters, emergence, survival and potential for seed production were evaluated. The model based on thermal accumulation to describe the Italian ryegrass emergence was developed and validated. The demographic parameters were combined with literature data to develop a population dynamics model for susceptible and resistant populations, including different management strategies and the effect of

the average temperature increase of 2.5°C. High variability in response of Italian ryegrass populations to glyphosate was observed, with resistance index ranging from 1.37 to 5.5. In two populations (MR20AR and RN02AR), an increase in the number of copies of the EPSPs gene (11 to 57x) was detected. Regarding demography, under favourable conditions, seedlings have a rapid emergence ( $\approx 30$  days), survival depends on plant *cohorts* (average 2 to 10%), seed production is strongly adjusted by plant density (90% with 50 pl m<sup>-2</sup>) in both populations. Resistant populations (13830 s pl<sup>-1</sup>) differed from the susceptible (20300 s pl<sup>-1</sup>) only in the seed production potential in low-density. The model based on the soil thermal accumulation proved efficient in describing the seedlings emergence, requiring 390 TT for the beginning of the emergence and 590 TT to reach 90% emergence. The population dynamics model showed that the seed bank of susceptible and resistant populations tends to stabilize at similar levels ( $\approx 20000$  s m<sup>-2</sup>) and that the average temperature increase of 2.5°C resulted in an increase in the number of seeds present in the bank ( $\approx 25000$  s m<sup>-2</sup>). Chemical management strategies and crop rotation with soybean/oat or corn/wheat demonstrated high efficiency and were able to suppress the Italian ryegrass seed bank by more than 75%. It is concluded that gene amplification is a mechanism involved in resistance of Italian ryegrass plants to glyphosate in South Region of Brazil. The predictive models developed in this thesis provide a better understanding of Italian ryegrass population development and the thermal model for emergence, could be used as a tool to assist in this species management.

**Keywords:** Italian ryegrass, herbicide resistance, resistance mechanism, weed management, thermal time, *cohorts*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática dos pontos de coleta. UTFPR – Pato Branco, 2016.....32
- Figura 2** - Umidade relativa ar máxima ( - . - ) e mínima ( ..... ), temperatura do ar máxima ( — ) e mínima ( - - ) durante o período de condução do experimento. UTFPR – Pato Branco, 2016.....34
- Figura 3** - Precipitação ( ■ ), Temperatura mínima ( — ) e máxima ( \_ \_ ) durante o período de condução dos experimentos durante o ano de 2018 em Pato Branco. Os pontos ( ■ ) indicam a data de implantação de cada *cohort* a campo. UTFPR – Pato Branco, 2018.....42
- Figura 4** - Precipitação ( ■ ), Temperatura máxima ( — ) e mínima ( \_ \_ ) do solo durante os períodos de condução dos experimentos durante as temporadas de 2016 em Mariópolis (A) e Pato Branco (B) e 2018 em Pato Branco (B). UTFPR – Pato Branco, 2018.....48
- Figura 5** - Diagrama utilizado para descrever o ciclo de vida de azevém. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....52
- Figura 6** - Diagrama utilizado para descrever as estratégias de manejo de azevém. O fluxo de emergência e o desenvolvimento de cada *cohort* estão descritos no presente trabalho, enquanto que o plantio das culturas é adaptado de GALVAN *et al.*, (2015). IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....59
- Figura 7** – Controle (%) aos 14 dias após a aplicação de glyphosate em populações de azevém suscetíveis (a) e resistentes (b) ao herbicida. Os pontos representam os valores médios de quatro repetições e as barras correspondem ao seu erro padrão. Os parâmetros das equações estão na Tabela 8. UTFPR – Pato Branco, 2017.....62
- Figura 8** – Controle (%) aos 28 dias após a aplicação de glyphosate em populações de azevém suscetíveis (a) e resistentes (b) ao herbicida. Os pontos representam os valores médios de quatro repetições e as barras correspondem ao seu erro padrão. Os parâmetros das equações estão na Tabela 9. UTFPR – Pato Branco, 2017.....62
- Figura 9** - Massa da parte aérea seca (g pl<sup>-1</sup>) aos 28 dias após a aplicação de glyphosate em populações de azevém suscetíveis (a) e resistentes (b) ao herbicida. Os pontos representam os valores médios de quatro repetições e as barras correspondem ao seu erro padrão. Os parâmetros das equações estão na Tabela 10. UTFPR – Pato Branco, 2017.....62
- Figura 10** - Diagrama de violino combinado com diagrama de caixa para demonstrar a distribuição dos valores de  $LD_{50}$  e  $GR_{50}$  das populações suscetíveis e resistentes ao glyphosate quando avaliado o controle

aos 14 (a) e 28 (B) dias após a aplicação (DAA) e MPAS (C) aos 28 (DAA). O ponto representa a média geométrica das observações enquanto que a linha representa a mediana. UTFPR – Pato Branco, 2017.....67

**Figura 11** - Diagrama de violino combinado com diagrama de caixa para demonstrar a distribuição dos valores de  $LD_{90}$  e  $GR_{90}$  das populações suscetíveis e resistentes ao glyphosate quando avaliado o controle aos 28 (a) e MPAS (C) aos 28 dias após a aplicação. O ponto representa a média geométrica das observações enquanto que a linha representa a mediana. UTFPR – Pato Branco, 2017.....67

**Figura 12** - Massa da parte aérea seca aos 28 dias após a aplicação de glyphosate em seis populações de azevém oriundos da região Sudoeste do Paraná. Os pontos indicam a média de quatro repetições enquanto as barras representam o erro padrão da média dos valores estimados pela equação. Os parâmetros são observados na Tabela 11. UTFPR – Pato Branco, 2017.....72

**Figura 13** - Número de cópias do gene da EPSPs relativo a CCR (Cinnamoyl-CoA reductase) em populações de azevém suscetíveis e resistentes ao glyphosate. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....74

**Figura 14** - Nível de expressão da EPSPs ( $\times 10^5$ ), antes (0 horas) e após (24 horas) a aplicação de glyphosate (HAT) em populações de azevém suscetível e resistente ao glyphosate. IAS/CSIC – Córdoba, 2019....75

**Figura 15** - Relação entre: a) Nível de expressão da EPSPs (EPSPs:FN  $\times 10^5$ ) (24 HAT) e número de cópias do gene da EPSPs (EPSPs:CCR) ( $R^2 = 0,86$ ) e b) Nível de expressão da EPSPs (EPSPs:FN  $\times 10^5$ ) (24 HAT) e dose de glyphosate necessária para proporcionar 50% do injúria ( $LD_{50}$ ) ( $R^2 = 0,81$ ) em plantas azevém. IAS/CSIC – Córdoba, 2019...76

**Figura 16** - Precipitação (■) e emergência acumulada (—), de populações de azevém. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....81

**Figura 17** - Curvas de sobrevivência das *cohorts* de plantas de azevém suscetível e resistente ao glyphosate. IAS/CSIC – Córdoba, 2019....82

**Figura 18** - Caracteres reprodutivos de azevém, espigas por planta (a), espiguetas por espigas (b) e flores por espiguetas (c) em cada época de estabelecimento. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....84

**Figura 19** - Efeito da densidade sobre a produção de sementes de biotipos de *L. multiflorum* suscetíveis e resistentes a herbicidas. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....85

**Figura 20** - Emergência para cada tempo termal (A) e acumulada (B) de azevém observada para os municípios de Mariópolis e Pato Branco, dados coletados durante o ano de 2016. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....90

- Figura 21** - Emergência de azevém observada no município de Pato Branco. Dados coletados durante a temporada de 2018. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....91
- Figura 22** - Validação do fluxo de emergência de azevém. Dados coletados do experimento conduzido em 2018. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....92
- Figura 23** - Evolução do banco de sementes de populações de azevém, para o Cenário 1 considerando a temperatura média para o período de 2007 - 2017, para suscetível (a) e resistente (b) ao glyphosate, e para o cenário 2 com previsão de incremento médio na temperatura diária de 2,5 °C para suscetível (a) e resistente (b) ao glyphosate. Sob diferentes estratégias de manejo. **M1** = Pousio, **M2** = PosTC1 + PosPC2, **M3** = PosTC1 + PosTC2 + PosPC3, **M4** = PosPC2 + PosTC3, **M5** = T/S, **M6** = A/S, **M7** = A/C, **M8** = T/S/A/M, **M9** = A/S/A/M, **M10** = T/S/A/M/A/S. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....96
- Figura 24** - Rede semântica com algumas das sub áreas de conhecimento da Ciência de Plantas daninhas. Em destaque (caixas verdes), tópicos abrangidos na presente Tese. UTFPR – Pato Branco, 2020.....107

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Populações e seus devidos pontos de coleta, com latitude e longitude. UTFPR – Pato Branco, 2016.....33
- Tabela 2** - Distribuição granulométrica e atributos químicos de Latossolo Vermelho Distroférrico. UTFPR – Pato Branco, 2016.....34
- Tabela 3** - Nome e sequências de primers utilizadas para o sequenciamento e para determinação do número de cópias e expressão do gene da EPSPs em populações de azevém. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....37
- Tabela 4** - Distribuição granulométrica e atributos químicas do solo em que foram desenvolvidos os experimentos. UTFPR – Pato Branco, 2018.....42
- Tabela 5** - Características químicas e físicas dos solos em que foram desenvolvidos os ensaios em 2016 (Mariópolis e Pato Branco) e 2018 (Pato Branco). UTFPR – Pato Branco, 2018.....46
- Tabela 6** - Parâmetros demográficos e agrônômicos utilizados no modelo. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....57
- Tabela 7** - Estratégias químicas e culturais simuladas para o manejo de *L. multiflorum*. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....58
- Tabela 8.** Parâmetros da equação, dose necessária para proporcionar 50% de controle ( $LD_{50}$ ), fator resistência (Fr), coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$ ) e raiz do quadrado médio do erro (RQME) para a variável controle (%) aos 14 dias após a aplicação de glyphosate em 44 populações de azevém. UTFPR – Pato Branco, 2017.....63
- Tabela 9** - Parâmetros da equação, dose necessária para proporcionar 50% e 90% de controle ( $LD_{50}$  -  $LD_{90}$ ), fator resistência (Fr), coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$ ) e raiz do quadrado médio do erro (RQME) para a variável controle (%) aos 28 dias após a aplicação de glyphosate em 44 populações de azevém. UTFPR – Pato Branco, 2017.....64
- Tabela 10** - Parâmetros da equação, dose necessária para reduzir 50% e 90% da massa da parte aérea seca ( $GR_{50}$  -  $GR_{90}$ ), fator resistência (Fr), coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$ ) e raiz do quadrado médio do erro (RQME) para a variável massa da parte aérea seca (g pl<sup>-1</sup>) aos 28 dias após a aplicação de glyphosate em 44 populações de azevém. UTFPR – Pato Branco, 2017.....65
- Tabela 11** - Parâmetros da equação,  $R^2$  ajustado, raiz do quadrado médio do erro (RQME) e dose de glyphosate requerida para proporcionar 50% de injúria das plantas ( $GR_{50}$ ) de seis populações de azevém. FR indica o fator resistência. UTFPR – Pato Branco, 2017.....72

<b>Tabela 12</b> - Sequência parcial de nucleotídeos do cDNA da EPSPs isolado de populações de azevém suscetíveis e resistentes ao glyphosate. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....	73
<b>Tabela 13</b> - Sequencia parcial de nucleotídeos do cDNA da EPSPs isolada de populações de azevém suscetíveis e resistentes ao glyphosate. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....	73
<b>Tabela 14</b> - Sobrevivência média das populações de azevém suscetível e resistente ao glyphosate nas 3 épocas de estabelecimento. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....	82
<b>Tabela 15</b> - Comparação múltipla de pares sobre o padrão de sobrevivência entre as populações de azevém suscetível e resistente ao glyphosate em três <i>cohorts</i> . IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....	83
<b>Tabela 16</b> - Parâmetros do modelo de hipérbole retangular (eqn 1). Máxima capacidade de produção de sementes por planta de azevém ( $f$ ) e área requerida para produzir sementes ( $a$ ), raiz do quadrado médio do erro (RMSE) e o pseudo coeficiente de determinação ( $R^2$ ), para as populações suscetível e resistente ao glyphosate. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....	85
<b>Tabela 17</b> - Critério de informação de Akaike corrigido (AICc) para os modelos de Gompertz, Logistic e Weibull. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....	91
<b>Tabela 18</b> - Valores dos parâmetros e performance do modelo de Gompertz (Erro padrão entre parênteses). IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....	92
<b>Tabela 19</b> - Performance estatística para o modelo Gompertz. $R^2$ : Coeficiente de determinação; ME: Eficiência do modelo; CE: Coeficiente de erro; CD: Coeficiente de determinação do modelo. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....	93
<b>Tabela 20</b> - Análise de sensibilidade dos parâmetros utilizados no modelo para cada cenário de manejo para as populações suscetível e resistente considerando o Cenário 1. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....	102
<b>Tabela 21</b> - Análise de sensibilidade dos parâmetros utilizados no modelo para cada cenário de manejo para as populações suscetível e resistente considerando o Cenário 2. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.....	103

## **LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS**

CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA	Estados Unidos da América
IAS	Instituto de Agricultura Sostenible
PR	Unidade de Federação – Paraná
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

## LISTA DE ABREVIATURAS

®	Marca registrada
°C	Graus Célsius
ACCase	Acetil-CoA carboxilase
AICc	Critério de informação de Akaike corrigido
Al	Alumínio
ALS	Acetolactato sintase
C1	<i>Cohort 1</i>
C2	<i>Cohort 2</i>
C3	<i>Cohort 3</i>
Ca	Cálcio
CCR	cinnamoyl-CoA reductase
CD	Coeficiente de determinação do modelo
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CTC	Capacidade de troca de cátions
DAA	Dias após aplicação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EC	Erro de coeficiente
EM	Eficiência do modelo
EPSPs	5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase
exp	Exponencial
FR	Fator resistência
FS1	Fotossistema 1
FS2	Fotossistema 2
g.e.a. ha <sup>-1</sup>	Gramas de equivalente ácido por hectare
GC %	Bases C e G na cadeia do primer
gDNA	Ácido desoxirribonucleico genômico
GR <sub>50</sub>	Dose que proporciona redução da MPAS em 50%
GR <sub>90</sub>	Dose que proporciona redução da MPAS em 90%
H	Hidrogênio
IS	Índice de sensibilidade
K <sub>2</sub> O	Teor de potássio
km h <sup>-1</sup>	Quilômetros por hora
Kpa	Quilopascal
L ha <sup>-1</sup>	Litros por hectare
LD <sub>50</sub>	Dose que proporciona 50% de controle
LD <sub>90</sub>	Dose que proporciona 90% de controle
m	Metro
m <sup>-2</sup>	Metro quadrado
Mg	Magnésio
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
min	Minuto
ml	Microlitro
MO	Matéria orgânica
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MPAS	Matéria da parte aérea seca
NaOAc	Acetato de sódio

ng	Nano gramas
$p$	Probabilidade
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Teor de fósforo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PosP	Pós aplicação precoce
PosT	Pós aplicação tardia
$pR^2$	Pseudo coeficiente de determinação
Protox	Protoporfirinogênio oxidase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
RNA	Ácido ribonucleico
RQME	Raiz do quadrado médio do erro
RSS	Soma dos quadrados dos resíduos
SNPs	Polimorfismo de nucleotídeo único
Taq	Thermus aquaticus
Tm°	Temperatura de anelamento
TT	Tempo termal
USA	United States of America
USDA	United States Department of Agriculture
$\beta$	Beta
$\mu$ L	Micro litro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	24
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	30
2.1 Objetivo geral .....	30
2.2 Objetivos específicos .....	30
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA DE POPULAÇÕES DE AZEVÉM AO GLYPHOSATE NAS REGIÕES SUL E SUDOESTE PARANAENSE .....	31
3.1.1 <i>Coleta de sementes e classificação quanto a resistência</i> .....	31
3.1.2 <i>Curva de resposta a doses de glyphosate</i> .....	34
3.2 ESTUDO MOLECULAR DO MECANISMO RELACIONADO AO LOCAL DE AÇÃO ENVOLVIDO NA RESISTÊNCIA AO GLYPHOSATE EM POPULAÇÕES DE AZEVÉM .....	36
3.2.1 <i>Populações utilizadas e coleta de material vegetal</i> .....	36
3.2.2 <i>Desenho de primers</i> .....	37
3.2.3 <i>Extração de mRNA</i> .....	37
3.2.4 <i>Síntese de cDNA</i> .....	38
3.2.5 <i>Sequenciamento do gene da EPSPs</i> .....	38
3.2.6 <i>Expressão da EPSPs</i> .....	39
3.2.7 <i>Extração de gDNA</i> .....	40
3.2.8 <i>Número de cópias do gene da EPSPs</i> .....	40
3.3 DEMOGRAFIA DE AZEVÉM SUSCETÍVEL E RESISTENTE AO GLYPHOSATE .....	41
3.3.1 <i>Área de estudo e populações</i> .....	41
3.3.2 <i>Padrão de emergência das plântulas a campo</i> .....	43
3.3.3 <i>Sobrevivência e produção de sementes em diferentes cohorts</i> .....	43
3.3.4 <i>Efeito da densidade sobre o potencial de produção de sementes</i> .....	44
3.3.5 <i>Análises estatística</i> .....	45
3.4 PREVISÃO DA EMERGÊNCIA DE AZEVÉM UTILIZANDO O TEMPO TERMAL DO SOLO .....	46
3.4.1 <i>Locais de estudo</i> .....	46
3.4.2 <i>Análises estatísticas e desenvolvimento de modelos</i> .....	49
3.4.3 <i>Validação do modelo</i> .....	50
3.5 MODELANDO A DINÂMICA POPULACIONAL E ESTRATÉGIAS DE MANEJO DE AZEVÉM SOB DOIS CENÁRIOS CLIMÁTICOS .....	52
3.5.1 <i>Descrição do modelo</i> .....	52
3.5.2 <i>Emergência de plantas</i> .....	52
3.5.3 <i>Sobrevivência de plântulas</i> .....	54
3.5.4 <i>Produção de sementes</i> .....	54
3.5.5 <i>Banco de sementes</i> .....	56
3.5.6 <i>Parâmetros demográficos do modelo</i> .....	56
	22

3.5.7 Simulando estratégias de manejo .....	58
3.5.8 Análise de sensibilidade .....	59
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA DE POPULAÇÕES DE AZEVÉM AO GLYPHOSATE NAS REGIÕES SUL E SUDOESTE PARANAENSE .....	61
4.1.1 Resultados.....	61
4.1.1 Discussão .....	68
4.2 ESTUDO MOLECULAR DO MECANISMO RELACIONADO AO LOCAL DE AÇÃO ENVOLVIDO NA RESISTÊNCIA DE AZEVÉM AO GLYPHOSATE .....	71
4.2.1 Resultados.....	71
4.2.1.1 Dose resposta.....	71
4.2.1.2 Sequenciamento do gene da EPSPs.....	72
4.2.1.3 Número de cópias do gene da EPSPs .....	73
4.2.1.4 Expressão do gene da EPSPs.....	74
4.2.2 Discussão .....	76
4.3 DEMOGRAFIA DE AZEVÉM SUSCETIVEL E RESISTENTE AO GLYPHOSATE .....	80
4.3.1 Resultados.....	80
4.3.1.1 Emergência .....	80
4.3.1.2 Sobrevivência de plântulas em diferentes cohorts e populações .....	81
4.3.1.3 Caracteres reprodutivos em diferentes cohorts .....	83
4.3.1.4 Efeito da densidade sobre o potencial de produção de sementes .....	84
4.3.2 Discussão .....	86
4.4 PREVISÃO DA EMERGÊNCIA DE AZEVÉM UTILIZANDO O TEMPO TERMAL DO SOLO .....	90
4.4.1 Resultados.....	90
4.4.1 Discussão .....	93
4.5 MODELANDO A DINÂMICA POPULACIONAL E ESTRATÉGIAS DE MANEJO DE AZEVÉM SOB DOIS CENÁRIOS CLIMÁTICOS.....	95
4.5.1 Resultados.....	95
4.5.1.1 Cenário 1 (Temperatura média 2007 – 2017) .....	95
4.5.1.2 Cenário 2 (Incremento de 2.5°C na temperatura média).....	97
4.5.2 Discussão .....	98
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>105</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>107</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>113</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O azevém (*Lolium spp.*) é uma planta anual originada do Sul da Europa e atualmente é difundida por áreas de lavoura em todo o mundo (USDA, 2019). O gênero *Lolium* é composto por oito espécies, três delas alógamas (*L. multiflorum*, *L. perenne* e *L. rigidum*), quatro autógamas (*L. temulentum*, *L. remotum*, *L. persicum* e *L. loliaceum*) e uma espécie com ambos os tipos de polinização (*L. canariense*) (POLOK 2007). As espécies *L. multiflorum* e *L. perenne* são caracterizadas pela elevada semelhança entre si e a sua diferenciação pode ser difícil mesmo ao nível molecular (POLOK, 2007). Em muitos casos, a variabilidade entre indivíduos dentro da mesma espécie é muito maior do que entre as espécies. Alguns taxonomistas sugerem que *L. multiflorum* seja uma subespécie de *L. perenne*, por outro lado, autores tem sugerido que *L. multiflorum*, *L. perenne* e *L. rigidum* deveriam ser agrupadas dentro de uma única espécie (BULINSKA, RADOMSKA, LESTER, 1985; GIGÓN, VIGNA, YANNICCARI, 2017). As plantas do gênero se destacam pela rusticidade e alta capacidade adaptativa, sendo capaz de suportar elevadas variações do clima durante o ciclo (BOND *et al.*, 2014). Outra característica importante da espécie é a elevada prolificidade, proporcionando ressemeadura natural da área infestada (MAIA *et al.*, 2008). Esta particularidade, aliada à dormência de sementes, garante o sucesso infestante da espécie.

O azevém possui características que permitem aptidão a diferentes sistemas agrícolas e é amplamente utilizada em sistemas intensivos, como ocorre na Região Sul do Brasil. A alta capacidade de acúmulo de biomassa favorece o uso tanto para a produção de forragens em sistemas integrados, como para cobertura de solo em sistemas conservacionistas. A espécie é considerada como uma das principais plantas daninhas em áreas cultivadas com trigo no Brasil. Estudos apontam que o potencial de redução do rendimento de grãos de trigo, em convívio com o azevém podem chegar a 90% (TRUSLER *et al.*, 2007). A espécie também apresenta potencial de afetar cultivos de verão, podendo atingir 60% de redução do rendimento de grãos de milho quando a

infestação ocorre no início do desenvolvimento da cultura (NANDULA *et al.*, 2014).

O azevém ganhou maior notoriedade com o surgimento dos casos de resistência a herbicidas. A resistência, principalmente aos inibidores da EPSPS, representa uma grande ameaça ao setor agrícola, pois além de aumentar os custos de produção, pode inviabilizar o cultivo de determinada cultura na área infestada. Em estudo realizado por Adegas *et al.* (2017), foi observado que a resistência de azevém ao glyphosate pode proporcionar um aumento de até 150% no custo de controle da planta na cultura da soja. O fato se agrava quando há coexistência de outras espécies resistentes na área, como é o caso da buva (*Conyza* spp.), em que o aumento do custo de controle pode chegar a 165%.

Ao longo dos anos, o glyphosate foi o principal herbicida utilizado para o manejo do azevém, contudo, a aplicação consecutiva favoreceu a seleção de populações resistentes ao herbicida. No Brasil, o primeiro caso de resistência de azevém ao glyphosate foi registrado no ano de 2003 (VARGAS *et al.*, 2004). Uma das primeiras alternativas adotadas pelos agricultores ao perceberem que o controle não estava mais sendo satisfatório com o glyphosate em sua dose de rótulo, foi o incremento da dose. Todavia, a prática foi ineficiente e, além de aumentar os custos de aplicação, proporcionou a seleção de plantas com níveis de resistência ainda superiores. Com a perda de eficiência ao glyphosate, buscou-se herbicidas alternativos, dentre os quais se destacaram os inibidores da ACCase e ALS. O uso indiscriminado sem o devido planejamento e orientação propiciou o surgimento de novos casos de resistência, tais como casos de resistência simples ao herbicida iodosulfuron-methyl (inibidores da ALS) e resistência múltipla aos herbicidas glyphosate + iodosulfuron + pyroxsulam (EPSPs + ALS + ALS), glyphosate + clethodim (EPSPs + ACCase) e iodosulfuron + clethodim (ALS + ACCase) (HEAP, 2020). Mundialmente, a espécie apresenta resistência a oito mecanismos de ação herbicida (inibidores das enzimas EPSPs, ALS, ACCase, Glutamina sintase, inibidores do FS1 e FS2, síntese de carotenóides e síntese de aminoácidos de cadeia longa) (HEAP 2020). A elevada capacidade de disseminação da espécie, incluindo o tráfego

de equipamentos, máquinas, zoocoria, comercialização de sementes, entre outros, é um fator que contribui para o avanço da resistência a herbicidas.

Diferentes mecanismos já foram descritos por proporcionar a resistência de plantas ao glyphosate, sendo classificados como não relacionados ao local de ação e relacionados ao local de ação. Mecanismos não relacionados ao local de ação dificultam a chegada do herbicida ao local de ação, a enzima EPSPs (enol-piruvil-shiquimato-fosfato sintase), e são descritos como os mecanismos mais comuns de resistência de diferentes plantas daninhas ao glyphosate. Estes mecanismos envolvem reduzida absorção e translocação e casos raros que envolvem a metabolização do herbicida (DE CARVALHO *et al.*, 2012). Mecanismos relacionados ao local de ação são complexos e são relacionados com o gene que codifica a enzima EPSPs. Atualmente são descritos como mecanismos relacionados ao local de ação, a substituição de aminoácidos na sequência codificadora da proteína (mutações), a variação no número de cópias e a superexpressão do gene. O mecanismo mais recente relacionado a resistência ao glyphosate foi a variação do número de cópias do gene da EPSPs (POWLES *et al.*, 2010). Atualmente, foram diagnosticados o aumento do número de cópias em sete espécies de plantas resistentes ao inibidor da EPSPs e uma resistente aos inibidores da ACCase (PATTERSON *et al.* 2018). Em plantas de azevém, foram detectados como mecanismos de resistência ao glyphosate, a reduzida translocação, mutação e variação no número de cópias do gene da EPSPs (PEREZ-JONES *et al.*, 2007; SALAS *et al.*, 2012; FERNANDEZ-MORENO *et al.*, 2017). Em algumas populações, tem sido sugerido que o estreitamento dos vasos do floema pode estar relacionado com a translocação reduzida em plantas resistentes ao glyphosate (GALVAN *et al.*, 2012), no entanto acredita-se que o principal fator esteja relacionado com o sequestro vacuolar (GE *et al.*, 2012).

Estudos desenvolvidos com plantas resistentes a herbicidas indicam que o nível de resistência comumente se eleva de acordo com a complexidade dos mecanismos envolvidos. Frequentemente, baixos níveis de resistência são atribuídos a substituições únicas de aminoácidos no gene ou reduzida absorção/translocação. Enquanto que substituições duplas de

aminoácidos ou combinações de diferentes mecanismos proporcionam níveis de resistência elevados (VILA-AIUB *et al.*, 2019).

A resistência de azevém a diferentes herbicidas é um fato grave, principalmente considerando o cultivo de cereais de inverno. De fato, algumas populações no Brasil já apresentam resistência as principais moléculas herbicidas (inibidores da EPSPs, ALS e ACCase) comumente utilizadas para o manejo da espécie em meio a cereais de inverno. Isto faz os agricultores buscarem novas estratégias de manejo. O conhecimento da biologia, juntamente com a demografia da espécie permite identificar em quais etapas do ciclo de desenvolvimento as interferências podem ser mais efetivas, contribuindo para que sejam adotadas estratégias novas e mais eficientes de manejo.

A demografia é a área da ciência responsável pelo estudo de parâmetros populacionais, tais como natalidade, mortalidade, migração e emigração. Em plantas daninhas alguns destes parâmetros são descritos como: mortalidade de sementes no banco, emergência, sobrevivência, produção e dispersão de sementes. Estudos de parâmetros demográficos já foram conduzidos em diversas espécies de plantas daninhas, tais como *Conyza bonariensis*, *Digitaria sanguinalis*, *Avena fatua*, *Bassia scoparia* (GONZÁLEZ-DÍAZ *et al.*, 2007; GONZÁLEZ-DÍAZ, 2012; OREJA *et al.*, 2012; ZAMBRANO-NAVEA *et al.*, 2018; OSIPITAN *et al.*, 2019). O conhecimento da demografia é uma etapa importante, pois permite o melhor entendimento do comportamento das plantas daninhas e pode auxiliar na adoção de estratégias de manejo mais eficientes. Outro fator positivo a ser considerado no estudo da demografia é relacionado a sua aplicação em modelos de desenvolvimento de populações, como modelos de emergência e de dinâmica de populações.

A emergência é considerada como o mais importante evento demográfico dentro do ciclo de vida das plantas, sendo determinante para a sobrevivência e o sucesso reprodutivo do indivíduo (LEWANDROWSKI *et al.*, 2017). O início e a continuidade da emergência de plântulas é variável ano após ano, pois é dependente de condições ambientais, tais como luz, temperatura e umidade (TOZZI *et al.*, 2014). A habilidade de prever a emergência de plantas daninhas pode auxiliar no manejo destas e na implementação de estratégias de

manejo mais eficazes através da otimização do tempo de controle. O uso de modelos matemáticos para prever a emergência de plântulas é uma forma de determinar sob quais condições ambientais a semente teria maior probabilidade de germinar.

Os modelos que descrevem o fluxo de emergência de plântulas podem ser classificados como mecanicistas e empíricos (ZAMBRANO *et al.*, 2013; GONZÁLEZ-ANDÚJAR *et al.*, 2016). Modelos mecanicistas requerem conhecimento de processos biofísicos que impulsionam a germinação e são complexos de estudar. Estes modelos requerem um profundo entendimento da regulação da dormência das sementes, requisitos de germinação e crescimento das plântulas. Por outro lado, modelos empíricos podem ser desenvolvidos sem o nível de detalhe exigido em modelos mecanicistas, monitorando a emergência de plântulas ao longo do tempo e relacionando isso com o tempo térmico, hidrotérmico e foto-hidrotérmico apropriado (YOUSEFI *et al.*, 2014; ROYO ESNAL *et al.*, 2015). Modelos empíricos foram desenvolvidos para prever a emergência de plântulas em diferentes espécies de plantas daninhas (GONZÁLEZ-ANDÚJAR *et al.*, 2016) e apesar de serem menos complexos, demonstram ser eficientes para descrever a emergência de plântulas. Independente da complexidade, estes modelos podem ser utilizados como ferramentas para a tomada de decisão e para otimizar o uso de estratégias de manejo de plantas daninhas (GONZÁLEZ-ANDÚJAR *et al.*, 2016).

O conhecimento de parâmetros demográficos de plantas daninhas também fornece informações necessárias para o desenvolvimento de modelos de dinâmica de populações (GONZÁLEZ-ANDÚJAR *et al.*, 2010). O uso de modelos de dinâmica de populações permite que sejam realizadas projeções do comportamento de uma população a longo prazo. Os modelos permitem que sejam incluídas estratégias de manejo e a avaliação do seu impacto sobre a população das plantas a longo prazo. Esta é uma característica importante principalmente do ponto de vista econômico, pois a condução de experimentos em campo a longo prazo é onerosa e o tempo para a obtenção dos resultados é longo. O objetivo do uso de modelos matemáticos não é fazer uma representação exata do fenômeno, mas sim caracterizar o problema e extrapolar

as consequências das estratégias de manejo sobre a dinâmica populacional (GONZALEZ-ANDUJAR, 2008).

Diversos trabalhos já foram desenvolvidos a fim de avaliar a longo prazo o comportamento de populações de plantas daninhas de diferentes espécies (GONZÁLEZ-ANDÚJAR e FERNÁNDEZ-QUINTANILLA, 2004, ZAMBRANO-NAVEA *et al.*, 2016, GONZÁLEZ-DÍAZ *et al.*, 2007). Todavia, ainda são escassos os trabalhos que comparam a evolução de populações suscetíveis e resistentes a herbicidas (OSIPITAN *et al.*, 2019), que na maioria dos casos se limitam a inferências quanto a projeções da evolução da frequência de indivíduos resistentes a herbicidas (NEVE *et al.*, 2011, BAGAVATHIANNAN *et al.*, 2013).

Esta tese englobou diferentes setores do conhecimento dentro da área de plantas daninhas. Com isto, diferentes hipóteses foram testadas: 1) Existe elevada variabilidade de resposta entre populações de azevém das Regiões Sul e Sudoeste do Paraná. 2) O mecanismo de resistência de azevém pode estar relacionado com o local de ação do herbicida. 3) Populações suscetíveis e resistentes diferem quanto a parâmetros demográficos e isto pode afetar a emergência e a dinâmica populacional da espécie. Para confirmar se as hipóteses são verdadeiras, diferentes estudos foram conduzidos: 1.) Caracterização da resposta de populações de azevém ao glyphosate. 2.) Verificação do envolvimento do mecanismo relacionado ao local de ação na resistência de populações de azevém ao glyphosate. 3.) Estudo da demografia de azevém. 4.) Desenvolvimento de um modelo empírico para descrever o padrão de emergência de plântulas de azevém. 5.) Desenvolvimento de um modelo de dinâmica de populações de azevém.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Estudar aspectos da resistência ao glyphosate e desenvolver modelos preditivos de emergência e de dinâmica populacional com suporte a tomada de decisão para o manejo de azevém.

### 2.2 Objetivos específicos

Caracterizar a resposta ao glyphosate e determinar o fator resistência em populações de azevém coletados nas regiões Sul e Sudoeste Paranaense.

Estudar o envolvimento de mecanismo relacionado ao local de ação, na resistência ao glyphosate em populações de azevém.

Obter informações sobre a demografia de azevém, em populações suscetível e resistente ao glyphosate.

Desenvolver e validar um modelo empírico para descrever a emergência de azevém com base no acúmulo térmico do solo.

Desenvolver um modelo *cohort*-estocástico de dinâmica populacional de azevém em populações suscetível e resistente ao glyphosate e simular estratégias de manejo para a espécie sob o efeito de dois cenários climáticos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

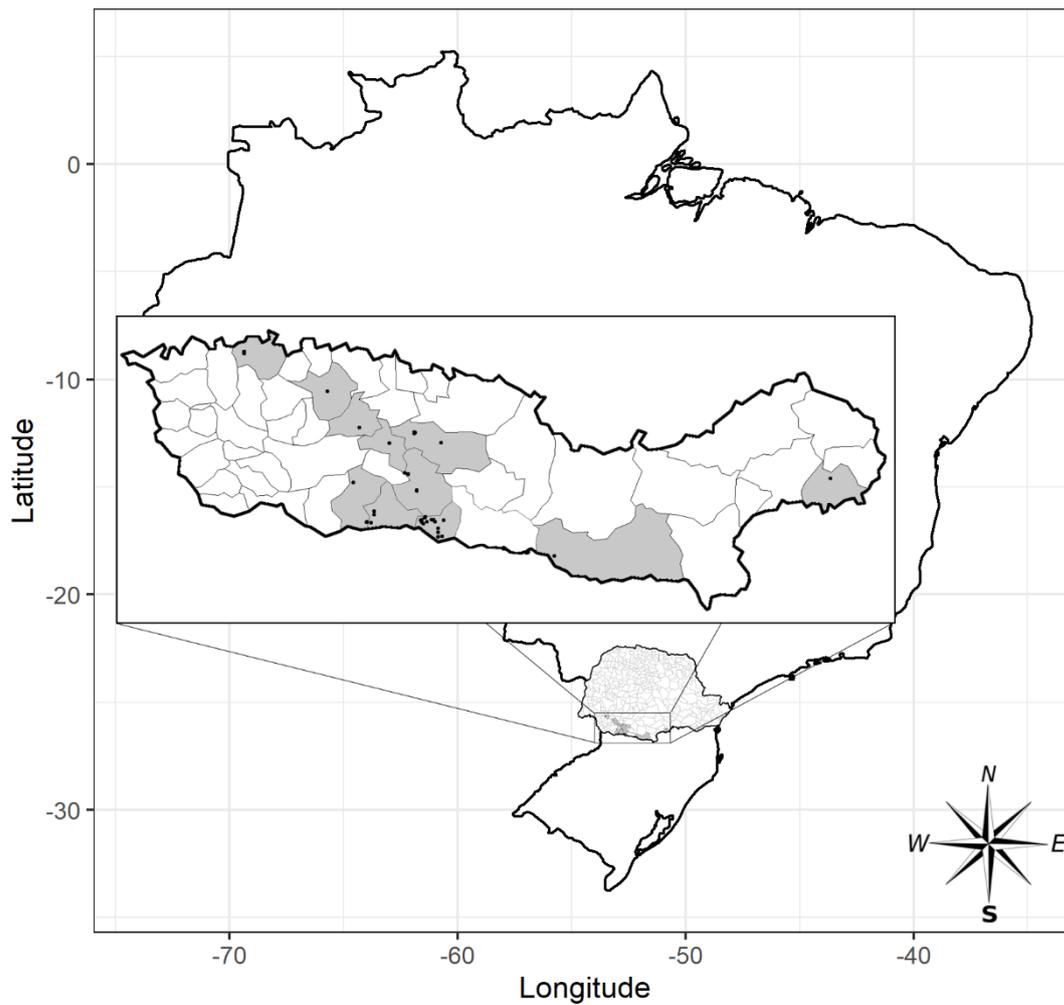
#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA DE POPULAÇÕES DE AZEVÉM AO GLYPHOSATE NAS REGIÕES SUL E SUDOESTE PARANAENSE

##### 3.1.1 Coleta de sementes e classificação quanto a resistência

Amostras de sementes de azevém foram coletadas entre os meses de outubro e novembro de 2016 em áreas de lavoura das regiões Sul e Sudoeste Paranaense. Em cada lavoura visitada, foram coletadas sementes de um “*bulk*” de 5 a 10 plantas. Cada “*bulk*” de sementes coletadas em uma lavoura foi considerado como uma população. As sementes foram alocadas em sacos de papel e armazenadas a 4 °C até o uso. Ao todo foram coletadas sementes de 44 populações (Figura 1, Tabela 1), em 11 municípios da Região.

A etapa de classificação das plantas quanto a resistência foi conduzida em casa de vegetação da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco (UTFPR-PB). O solo utilizado foi proveniente da Área Experimental da UTFPR-PB, sendo classificado como Latossolo Vermelho distroférico, cujos atributos químicos são apresentados na Tabela 2. Após a coleta, o solo foi peneirado para eliminar as partículas grosseiras e depositado em vasos plásticos com capacidade de 0,5 dm<sup>3</sup>. Em cada vaso, três por população, foram semeadas 20 sementes e no momento em que as plantas atingiram o estágio de dois a três perfilhos foi realizada a aplicação de dose discriminadora de 720 g e.a. ha<sup>-1</sup> de glyphosate. Aos 21 dias após a aplicação, foi avaliado o controle das plantas, em que elas foram classificadas como suscetíveis (100% das plantas mortas) e resistentes (ao menos uma planta sobrevivente).

**Figura 1** - Representação esquemática dos pontos de coleta. UTFPR – Pato Branco, 2016.



**Tabela 1** - Populações e seus devidos pontos de coleta, com latitude e longitude. UTFPR – Pato Branco, 2016.

Identificação	Pontos de coleta		
	Município	Latitude	Longitude
MR04AS	Mariópolis	26°19'15.2"	52°34'12.8"
MR05AS	Mariópolis	26°19'06.7"	52°37'32.5"
MR06AR	Mariópolis	26°19'40.8"	52°36'37.4"
MR07AS	Mariópolis	26°21'20.3"	52°35'41.6"
MR08AR	Mariópolis	26°22'28.0"	52°35'43.6"
MR12AS	Mariópolis	26°19'13.1"	52°40'17.4"
MR14AS	Mariópolis	26°19'04.2"	52°40'03.8"
MR15AR	Mariópolis	26°19'43.9"	52°40'00.6"
MR16AR	Mariópolis	26°18'19.1"	52°39'07.4"
MR18AR	Mariópolis	26°18'33.4"	52°39'10.9"
MR20AR	Mariópolis	26°19'38.9"	52°38'40.8"
MR22AR	Mariópolis	26°19'03.8"	52°36'57.6"
MR23AR	Mariópolis	26°23'35.9"	52°35'47.0"
MR25AR	Mariópolis	26°23'34.8"	52°34'37.9"
MR26AR	Mariópolis	26°20'06.2"	52°39'40.6"
VT02AR	Vitorino	26°16'51.0"	52°52'38.0"
VT03AR	Vitorino	26°17'46.0"	52°52'38.0"
VT04AR	Vitorino	26°19'43.0"	52°54'34.0"
VT05AR	Vitorino	26°19'46.4"	52°54'39.8"
VT06AR	Vitorino	26°19'56.0"	52°53'28.0"
VT07AS	Vitorino	26°19'40.6"	52°54'36.8"
CV01AR	Coronel Vivida	25°58'31.2"	52°35'01.0"
CV02AR	Coronel Vivida	25°55'41.0"	52°42'07.8"
CV03AS	Coronel Vivida	25°58'31.2"	52°35'01.0"
CV04AR	Coronel Vivida	25°56'04.7"	52°42'07.2"
CV05AR	Coronel Vivida	25°55'47.8"	52°41'47.5"
IO01AR	Itapejara do Oeste	25°58'40.4"	52°48'42.5"
IO02AR	Itapejara do Oeste	26°06'35.1"	52°44'40.2"
IO03AR	Itapejara do Oeste	26°06'59.5"	52°43'39.2"
IO04AR	Itapejara do Oeste	26°06'55.5"	52°43'46.1"
NP01AR	Nova Prata do Iguaçu	25°34'45.9"	53°27'07.3"
NP02AR	Nova Prata do Iguaçu	25°34'15.1"	53°27'01.3"
NP03AR	Nova Prata do Iguaçu	25°34'45.9"	53°27'07.3"
PB01AR	Pato Branco	26°11'07.4"	52°41'25.9"
PB02AR	Pato Branco	26°11'25.1"	52°41'23.7"
PB03AR	Pato Branco	26°06'56.2"	52°43'44.8"
PL04AS	Palmas	26°28'45.6"	52°04'57.1"
PL05AS	Palmas	26°27'36.3"	52°12'16.1"
PL07AR	Palmas	26°26'24.9"	52°18'16.9"
RN01AR	Renascença	26°09'08.3"	52°58'13.1"
RN01AS	Renascença	26°09'09.3"	52°58'08.8"
VR01AR	Verê	25°54'34.6"	52°56'35.3"
DV03AR	Dois vizinhos	25°44'50.1"	53°05'00.8"
UV01AS	União da Vitoria	26°08'00.8"	50°51'52.6"

**Tabela 2** - Distribuição granulométrica e atributos químicos de Latossolo Vermelho Distroférico. UTFPR – Pato Branco, 2017.

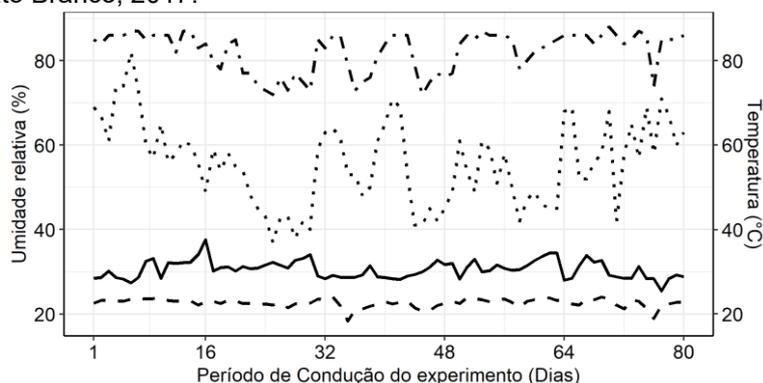
Distribuição granulométrica		Atributos químicos	
Componente	%	Componente	
Argila	81,00	MO <sup>1/</sup>	5,09
Areia	1,60	P <sup>2/</sup>	7,88
Silte	17,40	K <sup>3/</sup>	0,30
		CTC <sup>4/</sup>	14,80
		pH <sup>5/</sup>	4,80
		H+Al <sup>6/</sup>	5,98

<sup>1/</sup>Matéria orgânica (%); <sup>2/</sup>Fósforo (mg dm<sup>-3</sup>); <sup>3/</sup>Potássio (cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>); <sup>4/</sup>Capacidade de troca de cátions; <sup>5/</sup>pH do solo; <sup>6/</sup>Acidez trocável (cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>).

### 3.1.2 Curva de resposta a doses de glyphosate

O experimento foi conduzido casa de vegetação da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco (UTFPR-PB). Os atributos do solo são como previamente descritos. A temperatura e a umidade relativa do ar durante o período experimental são indicadas na Figura 2.

**Figura 2** - Umidade relativa ar máxima ( - - - ) e mínima ( ..... ), temperatura do ar máxima ( — ) e mínima ( - - ) durante o período de condução do experimento. UTFPR – Pato Branco, 2017.



O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. Os fatores foram constituídos por 44 populações de azevém e oito doses de glyphosate (0, 90, 180, 360, 720, 1440, 2880 e 5760 g.e.a. ha<sup>-1</sup>). Em cada vaso foram semeadas cinco sementes, após emergência e estabelecimento as plantas foram desbastadas, deixando-se

apenas duas. A irrigação foi realizada por sistema de nebulização, três vezes ao dia por período de três minutos cada sessão, controlada por sistema automatizado.

A aplicação do glyphosate ocorreu quando 50% ou mais das plantas emitiram o segundo perfilho. Foi utilizado um pulverizador costal de precisão, pressurizado com CO<sub>2</sub>, com pressão de 300 KPa, fornecendo vazão constante de 200 l ha<sup>-1</sup>, a velocidade de aplicação foi de 3,6 km h<sup>-1</sup>, a ponteira de aplicação foi a XR 110.02 Aos 14 e 28 dias após a aplicação (DAA), foi avaliado o controle das plantas através escala proposta por Frans *et al.*, (1986), em que 0 corresponde a ausência de sintomas do herbicida e 100 indica a morte da planta. Aos 28 DAA, as plantas foram cortadas rente ao solo e levadas para estufa de secagem com circulação forçada de ar a 60 °C. Após atingirem valor constante de massa foi determinada a massa da parte aérea seca (MPAS) das plantas. Os valores de MPAS foram expressos em g pl<sup>-1</sup>.

Os dados foram analisados utilizando o pacote “*drc*” (RITZ, STREIBIG, 2012) disponível para o aplicativo computacional R (R Core Team, 2018), utilizando o software RStudio (RSTUDIO, 2018). O modelo utilizado para descrever as variáveis respostas (Controle e MPAS) em função das doses crescentes de glyphosate foi o log-logístico de três parâmetros (Equação 1) (função “LL.3” do pacote “*drc*”):

$$y = \frac{d}{1 + \exp(b(\log(x) - \log(e)))} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que: **y** é a variável dependente, **x** é a dose do herbicida, **d** é o limite superior (assíntota máxima), **b** é a taxa de incremento e **e** é a dose do herbicida que reduz variável resposta em 50% ( $LD_{50}$  = dose que proporciona o controle de 50% das plantas,  $GR_{50}$  = dose que proporciona redução da MPAS em 50%). Através da função “ED” do pacote “*drc*”, foram determinados os valores de  $LD_{90}$  (dose que proporciona o controle de 90%), e  $GR_{90}$  (dose que proporciona redução da MPAS em 90%) para as variáveis Controle e MPAS aos 28 DAA. A qualidade do ajuste

da equação para cada população foi determinada através do R<sup>2</sup> ajustado e RQME (Raiz do quadrado médio do erro).

Através da Equação 2 foi determinado o fator resistência (FR) das populações resistentes.

$$Fr = \frac{x(\text{Resistente})}{x(\text{Suscetível})} \quad (\text{Equação 2})$$

Em que: **Fr** é o fator de resistência e **X** indica o  $LD_{50}$ ,  $GR_{50}$ ,  $LD_{90}$  ou  $GR_{90}$  das populações suscetíveis e resistentes.

Diagramas de violino e de caixa (boxplots) foram gerados para demonstrar a distribuição dos valores de o  $LD_{50}$ ,  $GR_{50}$ ,  $LD_{90}$  e  $GR_{90}$  das populações suscetíveis e resistentes dentro de cada variável. Os gráficos foram confeccionados através da função nativa da linguagem R, “plot” e através do pacote “GGplot2” (WICKHAM, 2016), com o aplicativo RStudio.

## 3.2 ESTUDO MOLECULAR DO MECANISMO RELACIONADO AO LOCAL DE AÇÃO ENVOLVIDO NA RESISTÊNCIA AO GLYPHOSATE EM POPULAÇÕES DE AZEVÉM

### 3.2.1 Populações utilizadas e coleta de material vegetal

Para o estudo do mecanismo relacionado ao local de ação envolvido na resistência de populações de azevém ao glyphosate, foram utilizadas as populações MR05AS, MR20AR, VT05AR, VT07AS, RN01AR e RN01AS, respectivamente, coletadas nos municípios de Mariópolis, Vitorino e Renascença (Tabela 1). O ensaio de curva dose resposta para a determinação do fator resistência das populações resistentes (nomes terminados com o sufixo “AR”) procedeu-se conforme descrito no Item 3.1.2 As populações resistentes foram comparadas com população suscetível do respectivo município de coleta.

Em casa de vegetação pertencente ao Instituto de Agricultura Sostenible (IAS/CSIC), Córdoba, Espanha, em vasos plásticos de 250 ml de substrato (areia e turfa 1:1) foram semeadas 16 sementes e após a emergência e estabelecimento das plântulas, procedeu-se desbaste em que foram deixadas apenas quatro plântulas. A temperatura da casa de vegetação durante todo o período experimental situou-se entre 20-30°C. Ao atingirem o estágio de quatro perfilhos, foi realizada a aplicação de glyphosate (720 g.e.a. ha<sup>-1</sup>). A coleta do material vegetal (50 a 100 mg) foi realizada a partir de folhas novas de um perfilho antes (0 horas) e após (24 horas) a aplicação do herbicida. As amostras foram armazenadas a -80°C.

### 3.2.2 Desenho de primers

Os primers foram desenhados com base nas regiões conservadas da sequência do gene da EPSPs de *L. multiflorum* (GenBank acesso: DQ153168), utilizando o software Primers3Plus (Untergasser *et al.*, 2007) (Tabela 3).

**Tabela 3** - Nome e sequências de primers utilizadas para o sequenciamento e para determinação do número de cópias e expressão do gene da EPSPs em populações de azevém. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.

Nome	Sequência (5' para 3')	Tm°	GC %
Lm_EPSPS_F	GGTCCCGATTGAAAAGGAT	63,8	45
Lm_EPSPS_2_R	CAAGTATTGGCTGCTGATGG	63,2	50
EPSPS_R2	TCGCTCCCTCATTCTTGGA	64,6	50
M13F <sup>1/</sup>	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC		
M13R <sup>1/</sup>	TCACACAGGAAACAGCTATGAC		
ADP_RF_For <sup>2/</sup>	TTCATGGTTGGTCTCGATG	63,8	50
ADP_RF_Rev <sup>2/</sup>	GGATGGTGGTGACGATCTCT	64,1	55
$\beta$ _Act_F1 <sup>1/</sup>	ATGGTAGGGATGGGACAGAA	63,1	50
$\beta$ _Act_R1 <sup>1/</sup>	TCCATGTCATCCCAGTTGCT	65,6	50
CCR_F <sup>3/</sup>	GATGTCTGAACAGAAAGCTCCA	66,6	52,3
CCR_R <sup>3/</sup>	GCAGCTAGGGTTTCCTTGTC	65,9	57,1

<sup>1/</sup>Alcántara-de la Cruz *et al.* (2016); <sup>2/</sup>Giménez *et al.* (2011); <sup>3/</sup>McInnes *et al.* (2002).

### 3.2.3 Extração de mRNA

A extração de *mRNA* foi realizada a partir das amostras 50 a 100 mg de tecido, seguindo a metodologia descrita para o reagente Trizol™ (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA). As amostras foram tratadas com DNase, seguindo o protocolo para o reagente TURBO DNA-free™ Kit (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA). O RNA foi purificado com LiCl 8M, a quantidade de RNA foi determinada em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) e a integridade foi verificada em gel de agarose 1%. As amostras foram armazenadas a -80°C.

#### 3.2.4 Síntese de cDNA

A metodologia foi desenvolvida conforme descrita para o Kit de síntese iScript cDNA (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA). Para a síntese de cDNA, as amostras de RNA foram diluídas a 1 µg. As condições do termociclador foram de priming a 25°C por 5 min, transcrição reversa a 46°C por 20 min, inativação da transcrição reversa a 95°C por 1 min, por fim mantidas a 4°C.

#### 3.2.5 Sequenciamento do gene da EPSPs

Amostras de cDNA de duas plantas de cada população foram diluídas em 5x (80 µl de H<sub>2</sub>O<sub>nfree</sub> + 20 µL de solução de cDNA) para se obter 25 ng/µL. A Master Mix foi preparada contendo: Lm\_EPSPS\_F (0,5 µl), Lm\_EPSPS\_2\_R (0,5 µl), Buffer MgCl<sub>2</sub> free (2 µl), MgCl<sub>2</sub> (1 ul), dNTPs (0,4 µl), Taq (0,13 µl), cDNA (2,5 ul) e H<sub>2</sub>O<sub>nfree</sub> (12,97 µl). As condições do termociclador foram: 1 ciclo de 95°C por 4 min, seguido por 35 ciclos a 95°C por 30 s, 58°C por 30 s e 72°C por 30 s, por fim extensão final de 72°C por 7 min. Os produtos da PCR foram purificados em NaOAc 3 M. A etapa de ligação foi realizada seguindo o protocolo de pSpark® TA DNA cloning system (Canvax, CO, ES). A transformação foi realizada em *Escherichia coli* DH5α por choque térmico e incubadas a 37°C por 12 a 16 horas. A seleção dos transformantes positivos e a

inserção do fragmento foi confirmada por PCR. A Master Mix foi preparada contendo: M13F (0,5 µl), M13R (0,5 µl), Buffer MgCl<sub>2</sub> *free* (2 µl), MgCl<sub>2</sub> (1 µl), dNTPs (0,4 µl), Taq (0,13 µl), cDNA (2,5 µl) e H<sub>2</sub>O<sub>*nfree*</sub> (12,97 µl). As condições do termociclador foram: 1 ciclo de 95°C por 4 min, seguido por 35 ciclos a 95°C por 30 s, 58°C por 30 s e 72°C por 30 s, por fim extensão final de 72°C por 7 min. O processo de purificação do plasmídeo foi desenvolvido seguindo a metodologia descrita para illustra<sup>Tm</sup> plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare Life Sciences, US). O sequenciamento Sanger foi realizado pelo serviço de sequenciamento STABVIDA (Caparica, Portugal). Foram sequenciados um total de oito clones de cada população. O alinhamento das sequências foi realizado com os softwares Geneious (Versão 8.1.8, Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand) e Unipro UGENE (Versão 1.32, Unipro Ltd, Novosibirsk, Russia).

### 3.2.6 Expressão da EPSPs

Par avaliar a expressão em qPCR, foram utilizadas três plantas de cada população, a partir das amostras coletadas antes (0 horas) e após (24 horas) a aplicação de 720 g.e.a. ha<sup>-1</sup> de glyphosate. Os genes de referência utilizados foram ADP-ribosylation e β-Actin. Os primers Lm\_EPSPS\_F + EPSPS\_R2 foram utilizados como alvo e amplificam um fragmento de 148pb. Foi preparado uma master mix contendo Buffer 2x (10 µl) e primer mix (0.5 µl), cDNA (5 µl) e H<sub>2</sub>O<sub>*nfree*</sub> (4.5 µl) resultando em um volume final de 20 µl. As condições do termociclador foram: 1 ciclo de 95°C por 3 min, seguido por 35 ciclos a 95°C por 10 s e 60°C por 30 s.

As reações de PCR foram conduzidas utilizando um termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA). Duas a três repetições técnicas por planta foram conduzidas em delineamento inteiramente casualizado. A eficiência da PCR para cada par de primer e amostra foi calculada pelo software LinRegPCR o (Ruijter *et al.* 2009) utilizando os dados brutos de fluorescência com os dados de entrada. O nível de expressão para os genes (referência e alvo) para cada amostra foi determinado com a equação 3.

$$N_0 = \frac{0.2}{E^{Cq}} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: **N<sub>0</sub>** é o nível de expressão do gene, **E** é a eficiência da PCR para cada primer, **Cq** é o número de ciclos necessário para alcançar unidades de fluorescência arbitrárias. A eficiência média da PCR para cada gene e amostra foi determinada de acordo com descrito por Giménez *et al.* (2011). A estabilidade da expressão dos genes de referência e o fator de normalização foram determinados utilizando o software geNorm para cada amostra, conforme descrito por o Vandesompele *et al.* (2002).

### 3.2.7 Extração de gDNA

A extração de gDNA foi realizada a partir de amostras de 50 a 100 mg, seguindo a metodologia descrita para o reagente CTAB+DDT. O DNA foi purificado com LiCl 8M. A quantidade de DNA foi determinada em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) e a integridade foi verificada em gel de agarose a 1%.

### 3.2.8 Número de cópias do gene da EPSPs

O número de cópias foi determinado a partir de amostras de gDNA de três plantas de cada população. O gene de referência utilizado foi o CCR (cinnamoyl-CoA-reductase) (CCR\_F e CCR\_R) por apresentarem baixo número de cópias em plantas. Os pares de primers Lm\_EPSPS\_F + EPSPS\_R2 foram utilizados como alvo e amplificam um fragmento de 148pb. Foi preparado uma master mix contendo Buffer 2x (10 µl) e primer mix (0.5 µl), DNA (5 µl) e H<sub>2</sub>O<sub>ntree</sub> (4.5 µl) resultando em um volume final de 20 µl. As condições do termociclador foram: 1 ciclo de 95°C por 3 min, seguido por 40 ciclos a 95°C por 10 s e 60°C por 30 s.

As reações de PCR foram conduzidas utilizando um termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA). A eficiência da PCR foi calculada pelo software LinRegPCR (Ruijter *et al.* 2009) utilizando os dados brutos de fluorescência com os dados de entrada. O número de cópias para cada amostra foram determinados pela Equação 4.

$$NC_0 = \frac{0.2}{EC^q} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:  **$NC_0$**  é o número de cópias,  **$E$**  é a eficiência da PCR para cada primer,  **$Cq$**  é o número de ciclos necessário para alcançar unidades de fluorescência arbitrárias.

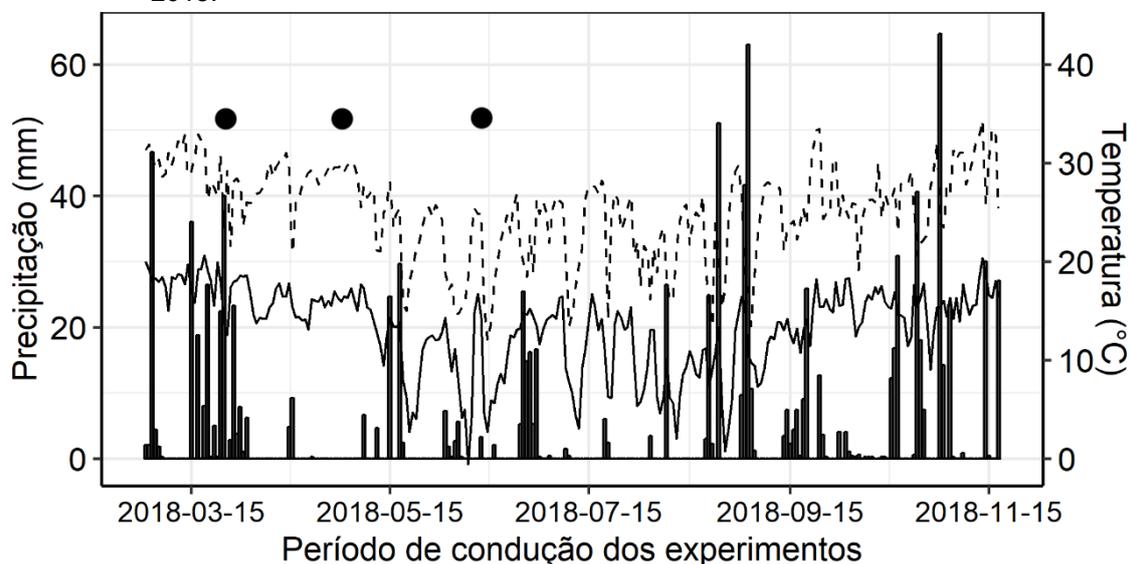
Os resultados foram expressados como o número de vezes que a EPSPs aumenta relativamente a CCR.

### 3.3 DEMOGRAFIA DE AZEVÉM SUSCETÍVEL E RESISTENTE AO GLYPHOSATE

#### 3.3.1 Área de estudo e populações

Uma série de experimentos foram conduzidos entre os meses de março e novembro de 2018 em casa de vegetação e a campo na área experimental pertencente a Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco (26°10'32.6"S 52°41'11.2"W). O clima da região é classificado como subtropical úmido do tipo Cfa conforme a classificação de KöppenGeiger (PEEL; FINLAYSON; MCMAHON, 2007). As condições ambientais durante o período de condução dos experimentos estão apresentadas na Figura 3, e as características físicas e químicas do solo na Tabela 4.

**Figura 3** - Precipitação (■), Temperatura mínima (—) e máxima (---) durante o período de condução dos experimentos durante o ano de 2018 em Pato Branco. Os pontos (●) indicam a data de implantação de cada *cohort* a campo. UTFPR – Pato Branco, 2018.



Fonte: Simepar (Sistema Meteorológico do Paraná).

**Tabela 4** - Distribuição granulométrica e atributos químicos do solo em que foram desenvolvidos os experimentos. UTFPR – Pato Branco, 2018.

Distribuição granulométrica		Atributos químicos	
Argila	55,7	MO <sup>1/</sup>	49,6
Areia	3,0	P <sup>2/</sup>	8,9
Silte	41,3	K <sup>3/</sup>	0,7
		CTC <sup>4/</sup>	13,8
		pH <sup>5/</sup>	4,8
		H+AL <sup>6/</sup>	5,8

<sup>1/</sup> Matéria orgânica (g dm<sup>-3</sup>); <sup>2/</sup> Fósforo (mg dm<sup>-3</sup>); <sup>3/</sup> Potássio (cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>); <sup>4/</sup> Capacidade de troca de cátions; <sup>5/</sup> pH do solo; <sup>6/</sup> Acidez trocável (cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>).

As sementes de azevém foram coletadas em áreas de lavoura da Região Sudoeste do Paraná (26°19'S 52°46'W). As sementes de plantas resistentes foram coletadas em área com histórico de resistência a herbicidas (>15 anos) e as suscetíveis foram coletadas em uma área próxima (<2 km) com histórico conhecido de plantas suscetíveis. Para verificar se havia contaminação de sementes suscetíveis em meio às resistentes ou resistentes em meio as suscetíveis, amostras de sementes foram semeadas em vasos plásticos, quando as plântulas estavam no estágio de 2 a 3 perfilhos, foi aplicado glifosato (720 g.e.a. ha<sup>-1</sup>). Aos 21 dias após a aplicação, foi avaliada a sobrevivência de

plantas, confirmando que as populações de sementes não apresentavam contaminação, conforme descrito no item 3.1.1.

### 3.3.2 Padrão de emergência das plântulas a campo

O experimento foi conduzido em blocos ao acaso com oito repetições em esquema bifatorial. Os tratamentos foram constituídos pelas populações de azevém, suscetível e resistente ao glyphosate. Foram semeadas 50 sementes em micro-parcelas com dimensão de 0,5 x 0,5 m, distribuídas homogeneamente na superfície do solo e posteriormente cobertas por uma fina camada de solo ( $\approx$  1cm). A cada três dias foi realizada a contagem do número de plântulas emergidas até que não fossem mais observadas novas plântulas.

### 3.3.3 Sobrevivência e produção de sementes em diferentes cohorts

O experimento foi constituído de uma etapa preparatória, em casa-de-vegetação e outra etapa a campo. Na etapa preparatória, foram depositadas sementes e cultivadas as plântulas em bandejas de plástico de 294 células. Após a emissão da primeira folha, as plântulas foram transferidas para o campo.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com oito repetições. Os fatores foram constituídos por duas populações de azevém (susceptível e resistente ao glyphosate) e por três *cohorts* de plantas, os quais se referem aos meses de março, abril e junho. *Cohorts* podem ser definidos como frações de plantas que se estabelecem em diferentes épocas do ano. *Cohorts* foram estabelecidos mediante o plantio das sementes em casa de vegetação conforme a emergência natural de azevém, a qual ocorre principalmente entre os meses de março e junho (MAIA *et al.*, 2008): 14/03/2018 (*cohort* 1), 14/04/2018 (*cohort* 2) e 19/05/2018 (*cohort* 3) e o transplante a campo entre os dias 27/03/2018 (*cohort* 1), 30/04/2018 (*cohort* 2) e 13/06/2018 (*cohort* 3). Desta forma, cada *cohort* representa os períodos específicos do ano, com condições ambientais distintas, nas quais as plantas podem se desenvolver.

As parcelas possuíam dimensões de 2 x 1 m e em cada uma foram alocadas 50 plântulas de azevém. Durante o transplante foram selecionadas plântulas com maior semelhança de desenvolvimento. Os primeiros dias de implantação de cada *cohort* a campo foram acompanhados por períodos de precipitação (Figura 3) e quando necessário, foi realizada a irrigação manual para garantir o estabelecimento inicial das plântulas. Plântulas que não sobreviveram em período de cinco dias após o transplante foram substituídas por novas plântulas e após este período foi considerada a mortalidade natural das plântulas em função das condições do ambiente.

A sobrevivência foi determinada pela contagem semanal do número de plantas sobreviventes. Ao fim do ciclo das plantas foram determinados os caracteres reprodutivos de azevém, em 10 plantas coletadas na área útil (1 x 0.5m) de cada parcela, avaliou-se o número de espigas por planta espiguetas por espiga e flores por espiguetas.

#### *3.3.4 Efeito da densidade sobre o potencial de produção de sementes*

O sistema de cultivo de plântulas foi realizado conforme descrito no item anterior. A semeadura das sementes foi realizada no dia 07/07/2018 e o estabelecimento a campo no dia 18/07/2018. Os primeiros dias após o transplante foram caracterizados pela baixa precipitação (Figura 3) e para garantir o melhor desenvolvimento das plantas, foi realizada a irrigação complementar quando necessário.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso em esquema bifatorial, com oito repetições. Os fatores foram constituídos por duas populações de azevém (suscetível e resistente ao glyphosate) e por cinco densidades de plantas (1, 10, 15, 30 e 50 pl m<sup>-2</sup>) dispostas em parcelas de 1 x 1m.

Com exceção do tratamento com uma planta, nos demais tratamentos foram coletadas 10 plantas coletadas de cada parcela e realizada a contagem do número de flores por espiguetas.

A relação entre a densidade de plantas e o potencial de produção de sementes foi ajustado utilizando modelo de hipérbole retangular, conforme proposto por Cousens *et al.* (1986), na equação 4.

$$S = \frac{f}{1+ax} \quad (\text{Equação 4})$$

Em que: **S** é o potencial número de sementes produzidas (sementes m<sup>-2</sup>), **x** é a densidade de plantas (pl m<sup>-2</sup>) **f** é o potencial máximo de produção de sementes por planta quando a densidade se aproxima de 0 e **a** é a área requerida pela planta para produzir sementes.

### 3.3.5 Análises estatística

A análise de variância foi realizada para verificar o efeito das populações sobre o padrão de emergência de plântulas e das populações e *cohorts* sobre os caracteres reprodutivos ( $p < 0,05$ ). Foram realizadas com o pacote “*ExpDes.pt*” (FERREIRA *et al.*, 2016) disponível para o R (R CORE TEAM 2018). Os gráficos foram gerados com o auxílio do pacote “*GGplot2*” (WICKHAM, 2016) disponível para o software R.

Foi realizada a análise de sobrevivência baseada no teste Log Rank para testar os efeitos do *cohort* na sobrevivência até o estágio adulto para as populações suscetível e resistente. A comparação múltipla de pares entre *cohorts* foi realizada com base no teste de Holm-Sidak ( $p < 0,05$ ). Ambos foram realizados utilizando o Sigmaplot v.12.

O modelo dependente da densidade (equação 4) foi ajustado ao conjunto de dados com o pacote “*nls*” disponível para R, a qualidade do ajuste foi avaliada utilizando a raiz do quadrado médio do erro (RQME) e o pseudo coeficiente de determinação ( $pR^2$ ). A produção de sementes de cada população em baixa densidade (parâmetro *f*) foi comparada pelo teste *t* ( $p \leq 0.05$ ), conforme a equação 5.

$$t = \frac{f_s - f_r}{\sqrt{epm_s^2 + epm_r^2}} \quad (\text{Equação 5})$$

Em que  $f$  é conforme descrito acima,  $s$  e  $r$  representam suscetível e resistente respectivamente e  $epm$  é o erro padrão da média.

### 3.4 PREVISÃO DA EMERGÊNCIA DE AZEVÉM UTILIZANDO O TEMPO TERMAL DO SOLO

#### 3.4.1 Locais de estudo

Os experimentos foram conduzidos a campo em duas etapas. A primeira foi realizada entre os meses de abril e junho de 2016, em campos de pós-colheita de soja nos municípios de Mariópolis (26°19'48.0"S 52°40'00.4"W) e Pato Branco (26°10'32.6"S 52°41'11.2"W). As características do solo são apresentadas na Tabela 5.

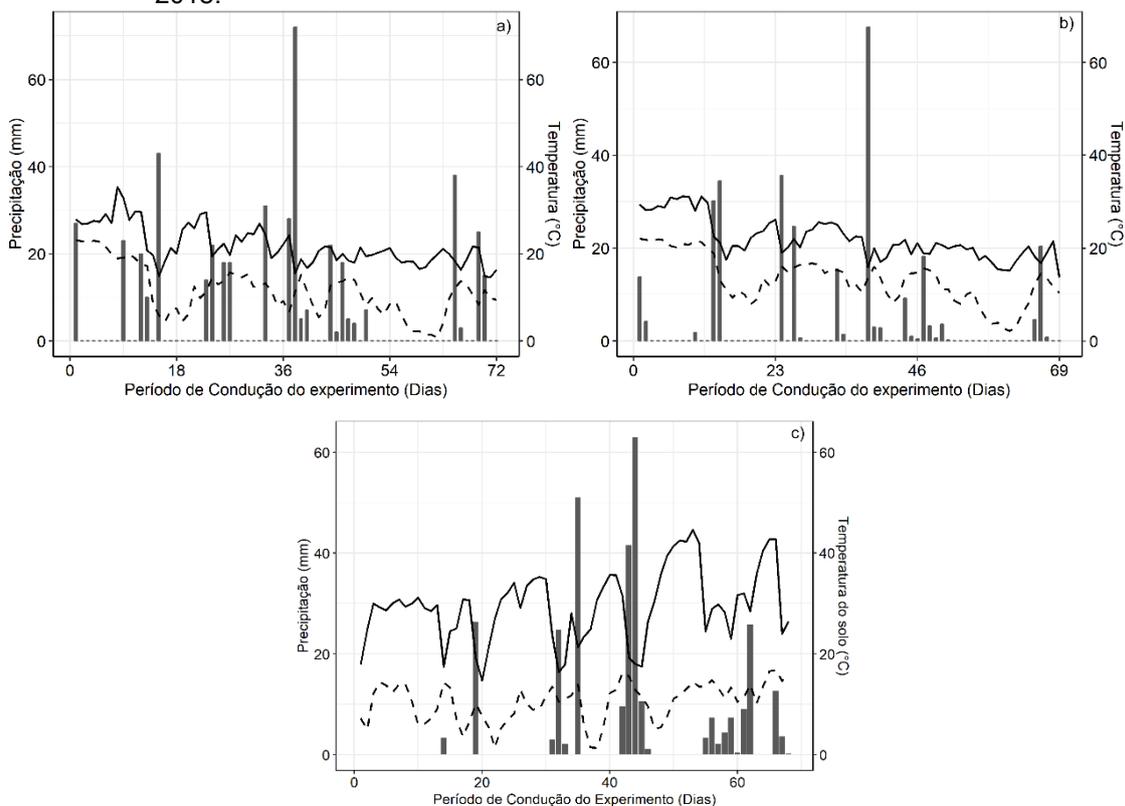
**Tabela 5** - Características químicas e físicas dos solos em que foram desenvolvidos os ensaios em 2016 (Mariópolis e Pato Branco) e 2018 (Pato Branco). UTFPR – Pato Branco, 2018.

Distribuição granulométrica			Atributos químicos		
2016					
Componente (%)	Mariópolis	Pato Branco	Componente (%)	Mariópolis	Pato Branco
Argila	58	55,7	MO <sup>1/</sup>	46,0	49,3
Areia	2,5	3,0	P <sup>2/</sup>	8,9	1,3
Silte	39,5	41,3	K <sup>3/</sup>	0,3	0,7
			CTC <sup>4/</sup>	17,8	17,6
			pH <sup>5/</sup>	5,2	5,6
			H+AL <sup>6/</sup>	9,0	5,3
2018					
Componente (%)	Pato Branco		Componente (%)	Pato Branco	
Argila	55,7		MO <sup>1/</sup>	49,6	
Areia	3,0		P <sup>2/</sup>	8,9	
Silte	41,3		K <sup>3/</sup>	0,7	
			CTC <sup>4/</sup>	13,8	
			pH <sup>5/</sup>	4,8	
			H+AL <sup>6/</sup>	5,8	

<sup>1/</sup> Matéria orgânica (g dm<sup>-3</sup>); <sup>2/</sup> Fósforo (mg dm<sup>-3</sup>); <sup>3/</sup> Potássio (cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>); <sup>4/</sup> Capacidade de troca de cátions; <sup>5/</sup> pH do solo; <sup>6/</sup> Acidez trocável (cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>).

Em cada local foi realizado o monitoramento da emergência natural de azevém, a partir do banco de sementes. Foram posicionadas aleatoriamente 10 quadrados de 0,25 m<sup>2</sup> (0,5 x 0,5m) em uma área de 100m<sup>2</sup>, no interior dos quais foram realizadas as contagens do número de plântulas emergidas. As contagens foram realizadas semanalmente, até o momento em que não foram mais observadas novas plântulas emergidas. Durante todo o período experimental o monitoramento da temperatura do solo foi efetuado por meio de sondas (Decagon Devices EC - TM®) ligadas a data loggers (Decagon Devices Em 50®), que realizavam a leitura e armazenavam os dados uma vez a cada hora. As sondas foram enterradas a 5 cm de profundidade, sendo este o perfil do solo onde se concentra a maior proporção do banco de sementes de azevém em sistemas de plantio direto (ICHIHARA *et al.*, 2010). Nos locais de avaliação, dentro dos perímetros amostrais foram distribuídas 4 sondas aleatoriamente, buscando proximidade com as estruturas de contagem. Os dados de precipitação e temperatura mínima e máxima do solo de cada local durante o período experimental são apresentados na Figura 4 (A e B).

**Figura 4** - Precipitação (■), Temperatura máxima (—) e mínima (---) do solo durante os períodos de condução dos experimentos durante as temporadas de 2016 em Mariópolis (A) e Pato Branco (B) e 2018 em Pato Branco (B). UTFPR – Pato Branco, 2018.



Fonte: Simepar (Sistema Meteorológico do Paraná).

A segunda etapa foi conduzida entre os meses de julho e setembro de 2018 em área de lavoura situada no município de Pato Branco – PR (26°10'35.9"S 52°41'26.8"W). A área selecionada possuía histórico de baixa infestação com azevém. As características químicas e físicas dos solos são apresentadas na Tabela 5. Na área onde foi conduzido o experimento, 90 dias antes da implantação, a vegetação foi eliminada com o uso de um cultivador (L90 Lavrale®) e a cada novo fluxo de emergência as plântulas foram eliminadas com os herbicidas paraquat + diuron (400 + 200 g.e.a. ha<sup>-1</sup>). Em 16 micro parcelas de 0,25 m<sup>2</sup> (0,5 x 0,5) foram semeadas em cada 50 sementes de azevém e cobertas com uma fina camada solo (≈1cm). As sementes de azevém utilizadas foram coletadas em diferentes lavouras da região Sudoeste do Paraná. O monitoramento do fluxo de emergência foi realizado a cada três dias, até que não fossem observadas novas plântulas emergidas. O registro de temperatura

do solo foi realizado uma vez a cada hora conforme descrito para a temporada de 2016. As sondas foram enterradas a uma profundidade de dois cm, buscando o registro das condições mais próximas as quais as sementes se encontravam. Os dados de precipitação e temperatura mínima e máxima do solo são apresentados na Figura 4C.

### 3.4.2 Análises estatísticas e desenvolvimento de modelos

Os dados coletados durante a etapa de 2016 foram submetidos a análise da variância ( $p \leq 0,05$ ), para verificar a existência de diferença entre os locais de amostragem, utilizando o pacote ExpDes.pt (FERREIRA *et al.*, 2018), disponível para a plataforma R (R Core Team 2018). O tempo térmico acumulado (TT) em graus-dia foi calculado utilizando a Equação 6.

$$TT = \sum_{i=1}^n (T_{média} - T_{base}) \quad (\text{Equação 6})$$

Em que  $n$  é o número de dias após a semeadura, ***T<sub>média</sub>*** é a temperatura média diária do solo (°C) e ***T<sub>base</sub>*** é a menor temperatura (°C) em que a germinação pode ocorrer. A temperatura base utilizada foi de 1,9 °C (TRIBOUILLOIS *et al.*, 2016).

Para descrever emergência acumulada, foram testados os modelos Logístico (Equação 7), Gompertz (Equação 8) e Weibull (Equação 9), comumente utilizados na literatura (González-Andújar *et al.*, 2016).

Gompertz

$$E_i = K \exp(-\exp(-b(TT - m))) \quad (\text{Equação 7})$$

Logístico

$$E_i = K / (1 + \exp(-b(TT - m))) \quad (\text{Equação 8})$$

Weibull

$$Ei = K (1 - \exp(-(b(TT - m))^c)) \quad (\text{Equação 9})$$

Em que: **Ei** representa a porcentagem de emergência acumulada prevista, **K** é a emergência máxima estimada pelo modelo (o valor foi fixado em 100%), **b** é a taxa de incremento na emergência, **m** é o ponto de inflexão no eixo **x** e **c** é o fator que determina a assimetria e a curtose da distribuição.

Os parâmetros da equação foram estimados juntamente a plataforma R através do aplicativo RStudio (RSTUDIO, 2018) utilizando a função nativa “*nls*”. Para a parametrização inicial foi utilizado o algoritmo “*Brutte-force*” do pacote “*nls2*”. (GROTHENDIECK, 2013). A qualidade do ajuste foi determinada por meio da raiz do quadrado médio do erro (RQME), em que o menor valor indica o melhor ajuste, e do coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$ ) como medida explicativa da variabilidade observada explicada pelo modelo, em que o maior valor indica o melhor ajuste. Os gráficos foram construídos com o uso do pacote “*GGplot2*” (WICKHAM, 2016), disponível para a plataforma R. O processo de seleção do modelo foi realizado através do critério de informação de Akaike corrigido (AICc) (Equação 10) (BURNHAM *et al.*, 2011).

$$AICc = n \log(RSS/n) + (2K(K + 1))/(n - K - 1) \quad (\text{Equação 10})$$

Em que: **RSS** indica a soma dos quadrados dos resíduos, **n** é o número de amostras, e **K** é o número de parâmetros do modelo.

### 3.4.3 Validação do modelo

A validação do modelo selecionado e gerado com os dados conduzidos durante a temporada de 2016 foi realizada com os dados coletados durante a temporada de 2018. A precisão da previsão do modelo foi avaliada pela comparação dos valores estimados e observados. Para verificar a qualidade do ajuste foram utilizados quatro métodos de validação: O coeficiente de

regressão ajustado ( $R^2$ ), a eficiência do modelo (EM), o erro de coeficiente (EC) e o coeficiente de determinação do modelo (CD).

O EM é uma estatística adimensional que se assemelha ao coeficiente de correlação de Pearson (LOAGUE e GREEN, 1991),

$$EM = 1 - \frac{\sum(y_i - \bar{y})^2 - \sum(\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2} \quad (\text{Equação 11})$$

Em que  $y_i$  é o  $i$ ésimo valor observado,  $\hat{y}_i$  é o  $i$ ésimo valor previsto pela linha de regressão ajustada,  $\bar{y}$  é a média aritmética dos valores observados. Para ser perfeito, o ajuste da EM deve ser equivalente a 1. O limite inferior é o infinito negativo e se é inferior a 0, os valores previstos pelo modelo são piores do que os observados na média.

O EC é uma mensuração relativa da média das diferenças absolutas, o qual é expressado como uma proporção dos valores observados na média (YANG *et al.*, 2000),

$$EC = \frac{(1/n) \sum |y_i - \hat{y}_i|}{\bar{y}}, \quad (\text{Equação 12})$$

Em que  $y_i$ ,  $\hat{y}_i$  e  $\bar{y}$  são descritos conforme citados acima e  $n$  é o número de observações. O valor de 0 para o EC representa um perfeito ajuste entre os valores previstos e observados.

O CD indica a proporção total de variação dos dados observados explicados pelos dados previstos (TEDESCHI 2006),

$$CD = \frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{\sum(\hat{y}_i - \bar{y})^2} \quad (\text{Equação 13})$$

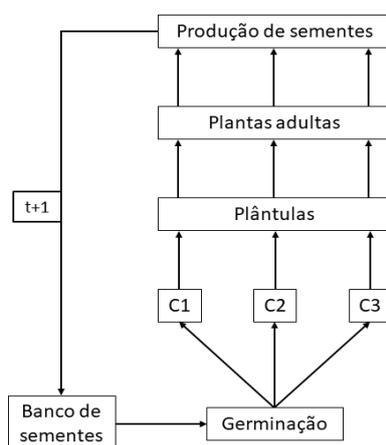
Em que  $y_i$ ,  $\hat{y}_i$  e  $\bar{y}$  são descritos conforme citados acima. Assim como o EM o ajuste perfeito deve ser igual a 1. O valor de  $CD > 1$  indica que os dados são subestimados pelo modelo, enquanto que  $CD < 1$  indica que os dados são superestimados.

### 3.5 MODELANDO A DINÂMICA POPULACIONAL E ESTRATÉGIAS DE MANEJO DE AZEVÉM SOB DOIS CENÁRIOS CLIMÁTICOS

#### 3.5.1 Descrição do modelo

A dinâmica populacional de azevém foi modelada de acordo com um modelo estocástico que considerou três *cohorts* de plântulas (março, abril e junho) (Figura 5), duas populações (suscetível e resistente ao glyphosate) e dois cenários climáticos. Cenário 1: Temperatura média do ar observada em um período de 10 anos (2007-2017). Cenário 2: Incremento da temperatura média do Cenário 1 em 2,5°C. Os três *cohorts* foram definidos por representarem as principais épocas de estabelecimento das plantas da espécie na Região Sul do Brasil, no início, meio e final da temporada. O fluxo de pólen entre as populações suscetível e resistente foi desconsiderado, buscando demonstrar o comportamento de populações puramente suscetíveis e puramente resistentes.

**Figura 5** - Diagrama utilizado para descrever o ciclo de vida de azevém. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.



#### 3.5.2 Emergência de plantas

A determinação do número de plantas emergidas em cada *cohort* foi realizada através do tempo termal acumulativo (TT) no solo, sendo ajustada através do modelo de Gompertz (Equação 14) conforme proposto no item 4.4.

$$Ei = 100 \exp(-\exp(-0.0151(TT - 444.20))) \quad (\text{Equação 14})$$

Aonde: **yd** é porcentagem de plântulas emergidas previstas e **TT** é o tempo termal. O tempo termal acumulativo em graus dia foi calculado através da Equação 6.

A estimativa do TT do solo foi realizada com base na temperatura do ar média diária em um período de 10 anos (2007 – 2017) ( $TT = 0.84TA + 3.81$ ;  $R^2 = 0.91$ ), para o município de Pato Branco - PR (26°10'32"S, 52°41'11"W), Brasil. A temperatura do ar e do solo apresentam elevada correlação, e na ausência de dados da temperatura do solo, a temperatura do ar pode ser utilizada para prever a emergência de plântulas (IZQUIERDO *et al.*, 2013). O período considerado para contabilizar o início do acúmulo térmico foi 10 de março, data em que foi realizado o plantio das sementes do primeiro *cohort* (item 3.3). Com base no acúmulo térmico observado, foi criado o Cenário 1.

É esperado que para o ano de 2050, a temperatura média diária para Região Sul do Brasil sofra um incremento de 2,5°C (ANDERSEN *et al.*, 2016), o que pode apresentar um impacto direto no fluxo de emergência de plantas e consequentemente nos períodos de estabelecimento a campo (*cohorts*). Desta forma, a informação foi incorporada ao modelo, produzindo o Cenário 2.

A proporção de plântulas emergidas em cada *cohort* foi determinada pela equação 15.

$$SDL_i = \left(\frac{y^d}{100}\right) SDL \quad (\text{Equação 15})$$

Em que:  **$SDL_i$**  é a emergência de plântulas (plântulas  $m^{-2}$ ) em cada *cohort* ( $i = 1...3$ ),  **$yd$**  é a porcentagem de plântulas emergidas até o dia  **$d$** ,  **$SDL$**  são as plântulas emergidas (plântulas  $m^{-2}$ ).

O número total de plântulas que podem emergir a partir do banco de sementes no ano  $t$  foi obtido através da equação 16.

$$SDL = SDL e \quad (\text{Equação 16})$$

Onde:  **$SDL$**  é o número de plântulas emergidas,  **$SB$**  é o banco de sementes e  **$e$**  é a taxa emergência.

### 3.5.3 Sobrevivência de plântulas

A campo, as plântulas estão expostas a fatores bióticos a abióticos que podem variar de acordo com cada *cohort*, e que impactam diretamente na sobrevivência e no número de plantas adultas. O número de plântulas sobreviventes que chegam ao estágio adulto em cada *cohort* é determinado pela Equação 17.

$$AP_i = SDL_i s d l s_i (1 - rc) \quad (\text{Equação 17})$$

Onde:  **$AP_i$**  é o número de plantas adultas (plantas  $m^{-2}$ ) em cada *cohort* ( $i = 1...3$ );  **$SDL_i$**  é o número de plântulas em cada *cohort*;  **$s d l s_i$**  é a taxa de sobrevivência de plântulas em cada *cohort* e  **$rc$**  é a taxa de controle pelo herbicida, quando aplicado.

### 3.5.4 Produção de sementes

A produção de sementes por planta é dependente da densidade e segue o modelo hiperbólico proposto por Cousens *et al.* (1986). A produção de

sementes pode ser afetada pela época de estabelecimento e pela capacidade de polinização, pelo fato da espécie ser de polinização cruzada obrigatória. A produção de sementes por planta foi determinada pela Equação 18.

$$SP_i = \frac{f(1-fr)(1-lp)(1-rc)}{(1+b AP_i)} \quad (\text{Equação 18})$$

Onde: **SP<sub>i</sub>** é a produção de sementes por planta<sup>-1</sup> com (*i* = 1...3), **f** é a produção de sementes por uma planta isolada (**AP** => 0), **fr** é o fator de redução, **b** é a área requerida por planta para produzir **f** sementes, **AP<sub>i</sub>** é o número de plantas adultas (plantas m<sup>-2</sup>) em cada *cohort* (*i* = 1...3), **lp** é a perda na polinização e **rc** é a taxa de controle pelo herbicida quando aplicado.

As sementes produzidas podem ser perdidas (removidas da área) de diferentes maneiras (ex. predadores). O número total de sementes produzidas (sementes m<sup>2</sup>) foi determinado pela equação 19.

$$TSP_i = (SP_i AP_i) (1 - l) \quad (\text{Equação 19})$$

Onde: **TSP<sub>i</sub>** é o total de sementes produzidas (sementes m<sup>-2</sup>) em cada *cohort* com (*i* = 1...3), **SP<sub>i</sub>** é a produção de sementes por uma planta em cada *cohort* (*i* = 1...3), **AP<sub>i</sub>** é o número de plantas adultas em cada *cohort* (*i* = 1...3) e **l** é a perda de sementes.

O número total de sementes produzidas nos 3 *cohorts* que retornarão ao banco de sementes foi obtido através da equação 20.

$$TSP = \sum_{t=1}^i (TSP_i) \quad (\text{Equação 20})$$

Onde: **TSP** é o total de sementes produzidas (sementes m<sup>2</sup>) por ano, **TSP<sub>i</sub>** é o total de sementes produzidas (sementes m<sup>-2</sup>) em cada *cohort*.

### 3.5.5 Banco de sementes

O banco de sementes é determinado pela quantidade de sementes remanescentes dos últimos anos e que não germinaram, não foram perdidas pela predação ou mortalidade natural e pela quantidade sementes produzidas no ano anterior. Equação 21.

$$SB = (SB_{t-1} (1 - e_{t-1})(1 - sm) + TSP_{t-1}) (1 - cr) \quad (\text{Equação 21})$$

**SB** é o banco de sementes, **SB<sub>t-1</sub>** é o banco de sementes no último ano, **e<sub>t-1</sub>** é a taxa de emergência no ano anterior, **sm** é a taxa de mortalidade no banco de sementes, **TSP<sub>t-1</sub>** é o total de sementes produzidas no último ano **cr** é o efeito de rotação de culturas quando aplicado.

### 3.5.6 Parâmetros demográficos do modelo

O modelo foi parametrizado com dados demográficos e agronômicos (Tabela 6) obtidos em experimentos realizados no município de Pato Branco (item 4.3) e por meio de dados obtidos a partir de artigos científicos. Em todas as simulações foi considerado que o banco de sementes inicial era de 2000 sementes m<sup>-2</sup> (GALVAN *et al.*, 2015).

**Tabela 6** - Parâmetros demográficos e agronômicos utilizados no modelo. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.

Parâmetro		Suscetível		Resistente		Referência
		Média	dp	Média	dp	
Banco de sementes						
Mortalidade de sementes no banco	<i>sm</i>	0.49	-	0.49	-	GALVAN <i>et al.</i> , (2015)
Emergência	<i>e</i>	0.73	0.04	0.73	0.04	Item 4.3
Plântulas						
Sobrevivência de plântulas	<i>sds<sub>i1</sub></i>	0.02	0.02	0.04	0.03	Item 4.3
Sobrevivência de plântulas	<i>sds<sub>i2</sub></i>	0.03	0.02	0.05	0.03	Item 4.3
Sobrevivência de plântulas	<i>sds<sub>i3</sub></i>	0.11	0.05	0.16	0.07	Item 4.3
Produção de sementes						
Fator de redução	<i>fr<sub>i1</sub></i>	0.07	0.07	0.02	0.06	Item 4.3
Fator de redução	<i>fr<sub>i2</sub></i>	0	-	0	-	Item 4.3
Fator de redução	<i>fr<sub>i3</sub></i>	0.46	0.1	0.34	0.12	Item 4.3
Máxima produção de sementes por planta	<i>f</i>	20300	1212	13830	1305	Item 4.3
Área para produzir <i>f</i> sementes	<i>b</i>	0.17	0.03	0.12	0.03	Item 4.3
Perda na polinização	<i>lp</i>	0.88	0.05	0.88	0.05	GREGOR, (1928)
Perda de sementes	<i>sl</i>	0.19	-	0.19	-	GONZÁLEZ-ANDÚJAR; FERNÁNDEZ-QUINTANILLA, (2004)
Manejo						
Taxa de controle (pós emergência precoce)	<i>rc<sub>postE</sub></i>	0.98	0.005	0.98	0.005	CHRISTOFOLETI <i>et al.</i> (2005)
Taxa de controle (pós emergência tardia)	<i>rc<sub>postL</sub></i>	0.91	0.008	0.91	0.008	CHRISTOFOLETI <i>et al.</i> (2005)
Rotação de culturas T/S	<i>cr<sub>1</sub></i>	0.89	0.03	0.89	0.03	GALVAN <i>et al.</i> , (2015)
Rotação de culturas A/S	<i>cr<sub>2</sub></i>	0.48	0.13	0.48	0.13	GALVAN <i>et al.</i> , (2015)
Rotação de culturas A/M	<i>cr<sub>3</sub></i>	0.89	0.03	0.89	0.03	GALVAN <i>et al.</i> , (2015)

\*dp = desvio padrão

Os parâmetros demográficos e de controle podem estar sujeitos a variações sob as condições do campo, desta forma, foram considerados como sendo estocásticos. Cada parâmetro foi modelado com base em taxas (exceto mortalidade de sementes e perdas de sementes) simulando seu valor como uma variável aleatória com distribuição beta, com média e desvio padrão com distribuição normal para fecundidade máxima de sementes por planta (*f*).

As porcentagens de controle estimadas foram obtidas com base em dados de literatura para azevém. Tanto os sistemas de manejo quanto a eficiência de controle foram os mesmos em ambas as populações. Para o manejo químico, foi considerada a aplicação de clethodim + glyphosate, o qual em condição de campo apresenta um potencial de controle de 98% em plantas jovens e 91% de eficiência em plantas adultas (CHRISTOFOLETI, 2005). Os níveis de controle foram considerados os mesmos para ambas as populações. Os sistemas de rotação/sucessão de cultura apresentados, indicam o impacto direto sobre o banco de sementes e já incluem, além do efeito cultural (competição da cultura de inverno com o azevém), o manejo com herbicidas para a cultura. Para mais detalhes ver GALVAN *et al.* (2015).

As simulações foram executadas por um período de 10 anos com 100 repetições cada.

### 3.5.7 Simulando estratégias de manejo

Foram simuladas diferentes estratégias de manejo, incluindo cultural e químico (Tabela 7).

**Tabela 7** - Estratégias químicas e culturais simuladas para o manejo de *L. multiflorum*. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.

Manejo	Ano 1		Ano 2		Ano 3	
	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão
M1	Pousio					
M2	PosTC1 + PosPC2*					
M3	PosTC1 + PosTC2 + PosPC3					
M4	PosTC2 + PosTC3					
M5	Trigo	Soja				
M6	Aveia	Soja				
M7	Aveia	Milho				
M8	Trigo	Soja	Aveia	Milho		
M9	Aveia	Soja	Aveia	Milho		
M10	Trigo	Soja	Aveia	Milho	Aveia	Soja

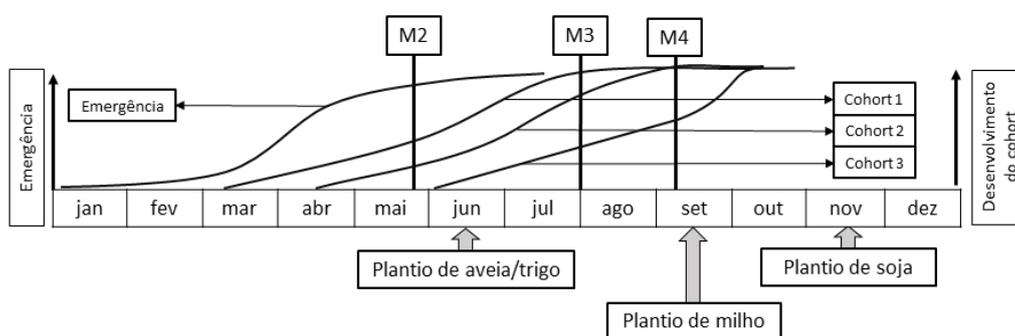
\*PosP - Pós emergência precoce; PosT - Pós emergência Tardia; C1, C2 e C3 equivalem aos *cohorts*.

Os ciclos se repetem de acordo com o número de anos em que são demonstrados, por exemplo, M1 permite que os 3 *cohorts* se desenvolvam sem nenhuma interferência e produzam sementes, sendo considerada a capacidade de suporte do ambiente e é a linha base para a comparação com os demais sistemas de manejo. A cultura de verão neste caso é ignorada, o ciclo se repete todos os anos.

As estratégias de manejo M2 até M4 indicam apenas o manejo químico, sem interferência de cultivos de inverno e independentemente do cultivo de verão. Em que C1, C2 e C3 indicam em qual *cohort* irá ocorrer a interferência e PosP = aplicação em pós emergência precoce (antes do florescimento das plantas de azevém), PosT = aplicação em pós emergência

tardia (após o florescimento das plantas de azevém). A representação esquemática do fluxo de emergência, estabelecimento e desenvolvimento de cada *cohort* e estratégias de manejo utilizadas são apresentas na Figura 6. As épocas de plantio das culturas foram adaptadas conforme descrito por GALVAN *et al.*, (2015).

**Figura 6** - Diagrama utilizado para descrever as estratégias de manejo de azevém. O fluxo de emergência e o desenvolvimento de cada *cohort* estão descritos no presente trabalho, enquanto que o plantio das culturas é adaptado de GALVAN *et al.*, (2015). IAS/CSIC – Córdoba, 2019.



As estratégias culturais são baseadas em rotações de culturas (M5 a M10) (Tabela 2). O efeito dos sistemas de rotação de culturas foi quantificado através de seu impacto direto sobre o banco de sementes. Estes sistemas de cultivo foram escolhidos por serem representativos ao ocorre na Região Sul do Brasil. Neste modelo, a alternância de culturas diferentes no verão mostra com maior precisão o que pode acontecer a campo e proporciona uma melhor compreensão dessas informações a longo prazo.

### 3.5.8 Análise de sensibilidade

A análise de sensibilidade foi conduzida para avaliar a reposta do modelo em função da variação dos parâmetros demográficos. Esta representa uma mensuração da alteração relativa da saída do modelo em função da mudança do valor do parâmetro. O coeficiente de sensibilidade é expressado matematicamente como um valor absoluto através da equação 22.

$$IS = \frac{O_{max} - O_{min}}{O_{max}} \quad (\text{Equação 22})$$

Em que: **IS** é o índice de sensibilidade, **O<sub>max</sub>** e **O<sub>min</sub>** representam os valores de saída do modelo quando os parâmetros demográficos são modificados pela adição (**O<sub>max</sub>**) ou subtração de 40% (**O<sub>min</sub>**) ao valor do parâmetro. A variação é considerada adequada para apresentar possíveis variações sob condições reais a campo (GONZALEZ-ANDUJAR e FERNANDEZ-QUINTANILLA, 1991).

Valores altos de **IS** indicam que pequenas variações nos parâmetros analisados podem resultar em elevada variação na saída do modelo.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA DE POPULAÇÕES DE AZEVÉM AO GLYPHOSATE NAS REGIÕES SUL E SUDOESTE PARANAENSE

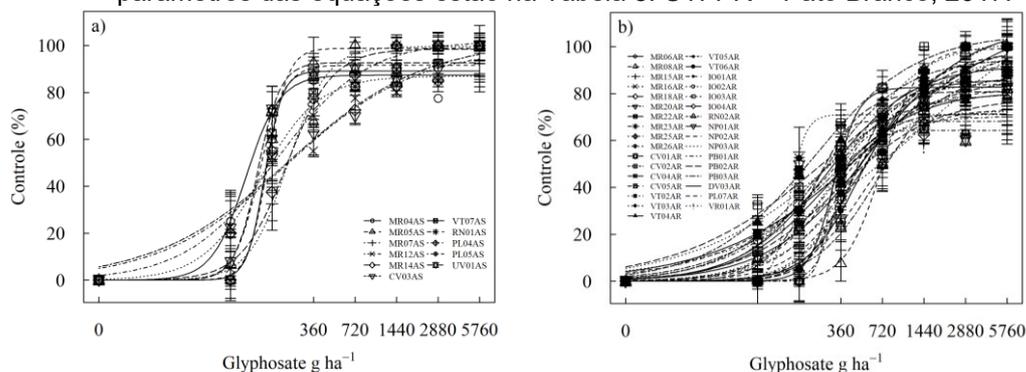
#### 4.1.1 Resultados

Das 44 populações estudadas, 11 foram caracterizadas com suscetíveis e 33 como resistentes. Às populações caracterizadas como suscetíveis, foi adicionado o sufixo AS (azevém suscetível) ao nome, enquanto que os demais foi adicionado o sufixo AR (azevém resistente) (Tabela 1). Independentemente da variável e da época de avaliação, os valores de  $R^2$  ajustado se situaram acima de 0.80 e os valores de RQME foram baixos (Tabelas 8, 9 e 10), confirmando que o modelo se ajustou adequadamente aos dados observados.

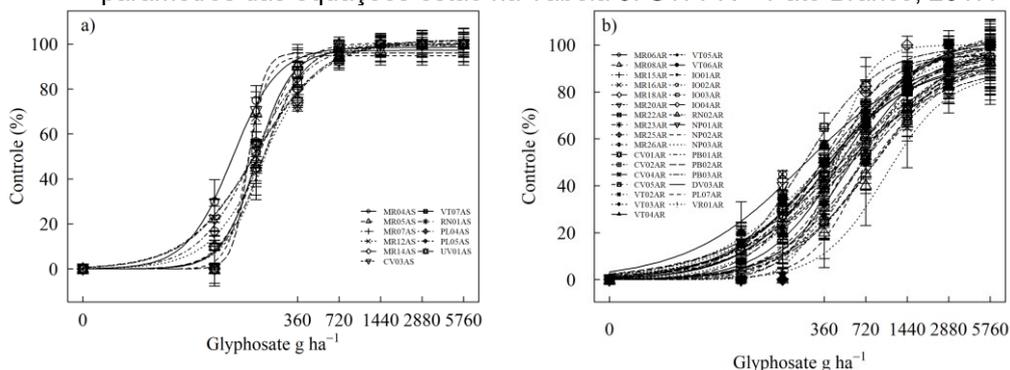
Independentemente da população, foram observados incrementos dos níveis de controle e redução da MPAS com a elevação das doses de glyphosate. Todavia, houve elevada variabilidade de resposta entre as populações (Figuras 7, 8 e 9). Aos 14 DAA a maior dose utilizada (5760 g.e.a.  $ha^{-1}$ ) proporcionou níveis de controle acima de 80% em populações suscetíveis e 60% em populações resistentes (Figura 7). Aos 28 DAA, a dose de 720 g.e.a.  $ha^{-1}$  proporcionou níveis de controle acima de 90% em todas as populações suscetíveis, todavia, a mesma dose proporcionou níveis de controle igual ou inferiores a 80% nas populações putativamente resistentes (Figura 8). O menor nível de controle com esta dose foi observado com a população NP03AR o qual foi de apenas 30%. Níveis de controle acima de 80% em populações resistentes foram observados apenas com 5760 g.e.a.  $ha^{-1}$  de glyphosate. A MPAS de todas as populações suscetíveis foi reduzida em mais de 85% com doses superiores a 720 g.e.a.  $ha^{-1}$  (Figura 9), todavia, com a mesma dose em populações resistentes a redução de massa variou de 25 a 80% em relação a testemunha não tratada

de cada população. A redução de massa acima de 80% foi observada apenas com doses superiores a 5760 g.e.a. ha<sup>-1</sup>.

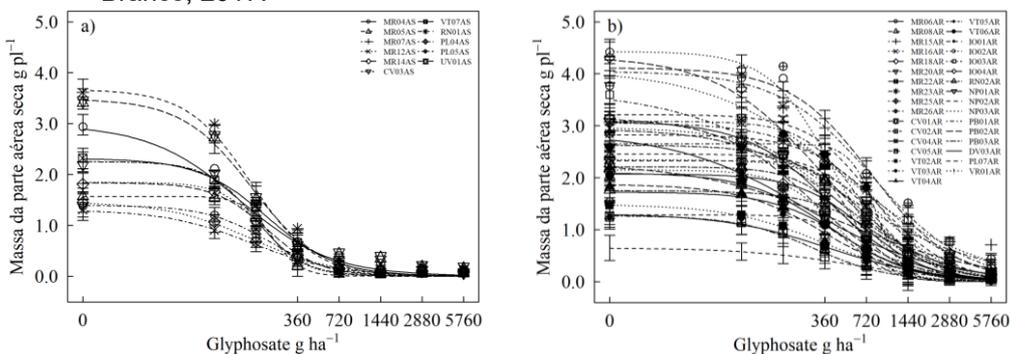
**Figura 7** – Controle (%) aos 14 dias após a aplicação de glyphosate em populações de azevém suscetíveis (a) e resistentes (b) ao herbicida. Os pontos representam os valores médios de quatro repetições e as barras correspondem ao seu erro padrão. Os parâmetros das equações estão na Tabela 8. UTFPR – Pato Branco, 2017.



**Figura 8** – Controle (%) aos 28 dias após a aplicação de glyphosate em populações de azevém suscetíveis (a) e resistentes (b) ao herbicida. Os pontos representam os valores médios de quatro repetições e as barras correspondem ao seu erro padrão. Os parâmetros das equações estão na Tabela 9. UTFPR – Pato Branco, 2017.



**Figura 9** - Massa da parte aérea seca (g pl<sup>-1</sup>) aos 28 dias após a aplicação de glyphosate em populações de azevém suscetíveis (a) e resistentes (b) ao herbicida. Os pontos representam os valores médios de quatro repetições e as barras correspondem ao seu erro padrão. Os parâmetros das equações estão na Tabela 10. UTFPR – Pato Branco, 2017.



O fator resistência (Fr) das populações resistentes foi determinado utilizando a média geométrica do  $LD_{50/90}$  e  $GR_{50/90}$  das populações suscetíveis em cada variável. Os valores médios foram de 182,87 ( $LD_{50}$  – controle 14 DAA), 177,35 ( $LD_{50}$  – controle 28 DAA), 186,78 ( $GR_{50}$  - MPAS), 415,00 ( $LD_{90}$  - controle 28 DAA) e 610,06 ( $GR_{90}$  - MPAS) (Tabelas 8, 9 e 10).

**Tabela 8.** Parâmetros da equação, dose necessária para proporcionar 50% de controle ( $LD_{50}$ ), fator resistência (Fr), coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$ ) e raiz do quadrado médio do erro (RQME) para a variável controle (%) aos 14 dias após a aplicação de glyphosate em 44 populações de azevém. UTFPR – Pato Branco, 2017.

População	<i>b</i>	<i>d</i>	$LD_{50}$	Fr	$R^2$	RQME
MR04AS	-3,55 (0,8)**	87,39 (2,52)**	116,2 (8,59)**	-	0,86	12,83
MR05AS	-5,96 (2,44)*	98,77 (1,85)**	167,82 (5,86)**	-	0,97	7,95
MR07AS	-3,08 (0,52)**	99,54 (2,94)**	234,9 (16,94)**	-	0,97	6,90
MR12AS	-0,93 (0,24)**	98,98 (8,62)**	233,22 (61,04)**	-	0,92	9,38
MR14AS	-2,63 (0,47)**	98,49 (3,15)**	230,6 (18,98)**	-	0,97	7,29
CV03AS	-0,89 (0,23)**	102,09 (9,63)**	242,02 (70,26)**	-	0,93	9,03
VT07AS	-6,72 (4,22)	89,13 (2,44)**	158,98 (12,32)**	-	0,92	11,51
RN01AS	-4,86 (1,56)**	91,6 (2,57)**	145,68 (8,66)**	-	0,89	13,08
PL04AS	-2,04 (0,62)**	87,04 (3,57)**	148,29 (15,84)**	-	0,85	13,36
PL05AS	-1,33 (0,27)**	102,1 (4,68)**	192,14 (28,26)**	-	0,88	13,74
UV01AS	-5,24 (1,23)**	92,7 (2,44)**	141,66 (9,27)**	-	0,95	8,90
Média	-	-	182,87	-	-	-
MR06AR	-0,81 (0,18)**	114,44 (15,97)**	585,96 (262,11)*	3,20	0,85	14,12
MR08AR	-3,34 (0,79)**	99,22 (3,98)**	721,3 (54,47)**	3,94	0,98	6,89
MR15AR	-7,83 (8,82) <sup>ns</sup>	71,05 (2,42)**	154,07 (25,65)**	0,84	0,82	14,23
MR16AR	-1,19 (0,21)**	94,7 (5,99)**	314,76 (59,98)**	1,72	0,87	12,79
MR18AR	-2,54 (0,53)**	80,85 (3,15)**	231,27 (23,42)**	1,26	0,87	13,00
MR20AR	-1,11 (0,27)**	87,27 (7,89)**	295,65 (80,92)**	1,62	0,83	13,56
MR22AR	-1,39 (0,31)**	80,71 (5,48)**	284,28 (56,31)**	1,55	0,89	10,37
MR23AR	-0,88 (0,21)**	105,29 (14,23)**	471,78 (202,35)*	2,58	0,85	13,63
MR25AR	-1,59 (0,24)**	101,98 (4,75)**	387,93 (48,01)**	2,12	0,99	4,91
MR26AR	-1,85 (0,43)**	70,29 (3,88)**	265,64 (40,67)**	1,45	0,87	10,85
CV01AR	-1,24 (0,34)**	78,25 (7,00)**	343,35 (94,3)**	1,88	0,88	10,90
CV02AR	-1,16 (0,21)**	105,68 (5,22)**	229,01 (34,62)**	1,25	0,92	10,41
CV04AR	-1,41 (0,29)**	92,07 (5,54)**	286,69 (49,62)**	1,57	0,89	12,40
CV05AR	-1,78 (0,36)**	97,25 (5,17)**	525,38 (62,78)**	2,87	0,96	7,46
VT02AR	-0,79 (0,16)**	116,43 (12,84)**	443,4 (160,25)**	2,42	0,96	7,26
VT03AR	-2,36 (0,49)**	84,12 (3,95)**	428,77 (46,66)**	2,34	0,96	7,66
VT04AR	-0,83 (0,2)**	104,87 (10,97)**	295,57 (98,67)**	1,62	0,91	10,23
VT05AR	-1,48 (0,25)**	94,98 (4,6)**	271,24 (38,33)**	1,48	0,90	12,17
VT06AR	-1,21 (0,18)**	109,15 (7,63)**	578,73 (107,91)**	3,16	0,96	8,13
IO01AR	-1,59 (0,29)**	98,09 (5,87)**	488,38 (68,84)**	2,67	0,97	7,12
IO02AR	-1,44 (0,28)**	97,05 (8,09)**	537,07 (113,17)**	2,94	0,94	9,18
IO03AR	-9,88 (18,37) <sup>ns</sup>	68,14 (2,68)**	303,51 (96,04)**	1,66	0,90	11,02
IO04AR	-2,95 (0,71)**	85,26 (3,73)**	426,8 (41,07)**	2,33	0,96	7,94
RN02AR	-1,92 (0,39)**	87,52 (5,63)**	667,84 (95,53)**	3,65	0,95	8,57
NP01AR	-4,82 (2,55) <sup>ns</sup>	82,67 (3,16)**	320,23 (18,99)**	1,75	0,93	10,95
NP02AR	-1,62 (0,33)**	81,84 (4,79)**	345,58 (54,79)**	1,89	0,93	8,59
NP03AR	-2,33 (1,15)*	72,24 (6,48)**	387,04 (89,29)**	2,12	0,87	12,31
PB01AR	-6,49 (8,77) <sup>ns</sup>	64,15 (2,95)**	333,91 (32,96)**	1,83	0,86	12,40
PB02AR	-2,88 (1,22)*	71,47 (4,55)**	380,69 (55,45)**	2,08	0,87	12,15
PB03AR	-1,36 (0,49)**	80,13 (7,11)**	207,5 (53,84)**	1,13	0,80	14,74
DV03AR	-2,33 (0,45)**	85,83 (4,14)**	477,39 (53,47)**	2,61	0,97	6,90
PL07AR	-2,06 (0,57)**	73,3 (4,96)**	504,65 (77,64)**	2,76	0,91	9,67
VR01AR	-0,85 (0,20)**	107,49 (17,60)**	701,88 (356,67)	7,37	0,88	11,66

<sup>1/</sup> Valores entre parênteses indicam o erro padrão.

\* e \*\* significativo a 5 e a 1% de probabilidade de erro respectivamente.

ns = não significativo.

**Tabela 9** - Parâmetros da equação, dose necessária para proporcionar 50% e 90% de controle ( $LD_{50}$ -  $LD_{90}$ ), fator resistência (Fr), coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$ ) e raiz do quadrado médio do erro (RQME) para a variável controle (%) aos 28 dias após a aplicação de glyphosate em 44 populações de azevém. UTFPR – Pato Branco, 2017.

População	b	d	$LD_{50}$	Fr- $LD_{50}$	$LD_{90}$	Fr- $LD_{90}$	$R^2$	RQME
MR04AS	-2,64 (0,48)**	98,54 (2,29)**	121,00 (7,67)**	-	278,21 (47,29)	-	0,94	9,32
MR05AS	-3,2 (0,53)**	100,53 (2,3)**	189,99 (10,18)**	-	377,47 (49,84)	-	0,97	7,71
MR07AS	-3,07 (0,45)**	100,03 (2,42)**	209,65 (12,67)**	-	428,77 (58,93)	-	0,97	7,46
MR12AS	-1,71 (0,24)**	101,69 (2,89)**	178,37 (15,09)**	-	645,03 (136,86)	-	0,92	11,16
MR14AS	-3,04 (0,47)**	99,35 (2,45)**	203,70 (12,63)**	-	419,7 (61,72)	-	0,97	6,89
CV03AS	-1,75 (0,24)**	101,93 (2,83)**	177,98 (14,70)**	-	625,01 (126,53)	-	0,94	9,18
VT07AS	-3,51 (0,79)**	97,18 (2,45)**	180,98 (10,85)**	-	338,18 (60,78)	-	0,96	8,05
RN01AS	-6,09 (2,45)*	94,76 (2,06)**	156,37 (8,05)**	-	224,35 (26,18)	-	0,93	11,04
PL04AS	-2,19 (0,31)**	99,86 (2,7)**	203,54 (14,98)**	-	556,13 (99,76)	-	0,94	9,90
PL05AS	-2,21 (0,38)**	100 (2,71)**	170,80 (13,76)**	-	461,38 (93,54)	-	0,97	6,82
UV01AS	-7,71 (5,52)	96,06 (2,01)**	158,50 (14,26)**	-	210,79 (26,19)	-	0,96	8,86
Média	-	-	177,35	-	415,00	-	-	-
MR06AR	-1,61 (0,25)**	100,62 (5,57)**	477,3 (70,38)**	2,69	1866,71 (609,85)	4,50	0,85	17,24
MR08AR	-2,24 (0,37)**	99,69 (4,44)**	721,15 (69,13)**	4,07	1925,37 (402,01)	4,64	0,95	10,11
MR15AR	-1,1 (0,26)**	93,88 (9,39)**	391,87 (114,95)**	2,21	2877,9 (2130,5)	6,93	0,83	14,90
MR16AR	-1,18 (0,17)**	108 (6,77)**	474,41 (83,34)**	2,67	3033,99 (1221,69)	7,31	0,90	12,66
MR18AR	-1,78 (0,29)**	96,42 (4,11)**	331,78 (37,3)**	1,87	1139,38 (312,76)	2,75	0,94	10,06
MR20AR	-0,99 (0,18)**	108,48 (11,96)**	670,4 (212,07)**	3,78	6164,88 (4278,11)	14,86	0,92	10,40
MR22AR	-1,43 (0,26)**	91,35 (5,29)**	354,69 (56,75)**	2,00	1654,65 (657,9)	3,99	0,91	11,00
MR23AR	-1,02 (0,2)**	104,35 (11,33)**	584,08 (182,82)**	3,29	5011,7 (3564)	12,08	0,88	12,70
MR25AR	-3,31 (0,59)**	100,02 (3,26)**	421,6 (29,32)**	2,38	819,64 (131,54)	1,98	0,99	4,85
MR26AR	-1,63 (0,26)**	94,76 (5,9)**	642,27 (96,23)**	3,62	2479,95 (816,07)	5,98	0,91	11,55
CV01AR	-0,92 (0,22)**	103,17 (13,76)**	559,54 (226,29)**	3,15	6142,54 (5757,15)	14,80	0,94	8,28
CV02AR	-1,65 (0,28)**	99,35 (4,01)**	257,29 (29,39)**	1,45	977,2 (284,79)	2,35	0,91	11,74
CV04AR	-1,03 (0,24)**	97,61 (7,33)**	253,44 (55,81)**	1,43	2119,88 (1397,84)	5,11	0,93	8,90
CV05AR	-1,97 (0,38)**	97,56 (4,58)**	527,05 (53,91)**	2,97	1611,38 (440,56)	3,88	0,97	6,88
VT02AR	-1,07 (0,18)**	108,37 (7,56)**	415,38 (83,4)**	2,34	3258,61 (1640,83)	7,85	0,94	9,38
VT03AR	-1,87 (0,31)**	95,88 (5,14)**	631,88 (76,82)**	3,56	2050,64 (571,48)	4,94	0,95	8,83
VT04AR	-1,31 (0,24)**	100,84 (5,67)**	355,95 (53,75)**	2,01	1902,3 (775,37)	4,58	0,85	14,78
VT05AR	-2,58 (0,46)**	95,38 (3,66)**	426,86 (37,66)**	2,41	1001,61 (206,98)	2,41	0,97	7,79
VT06AR	-1,34 (0,2)**	103,62 (5,76)**	420,6 (64,34)**	2,37	2156,84 (773,47)	5,20	0,96	7,97
IO01AR	-1,69 (0,28)**	102,97 (5,46)**	533,52 (63,79)**	3,01	1955,31 (573,72)	4,71	0,97	6,70
IO02AR	-1,5 (0,25)**	97,19 (5,62)**	407,68 (60,53)**	2,30	1771,96 (630,09)	4,27	0,95	8,62
IO03AR	-1,13 (0,23)**	95,33 (8,6)**	441,64 (115,35)**	2,49	3095,3 (1932,58)	7,46	0,91	10,25
IO04AR	-1,28 (0,22)**	95,8 (5,94)**	353,97 (62,74)**	2,00	1981,09 (863,83)	4,77	0,92	10,44
RN02AR	-1,33 (0,24)**	106,23 (9,69)**	909,38 (190,22)**	5,13	4757,54 (2288,08)	11,46	0,96	7,90
NP01AR	-1,25 (0,25)**	93,93 (6,57)**	340,94 (68,75)**	1,92	1968,01 (1010,22)	4,74	0,90	11,18
NP02AR	-1,13 (0,23)**	98,7 (10,07)**	554,14 (158,65)**	3,12	3887,98 (2556,55)	9,37	0,92	9,95
NP03AR	-1,9 (0,43)**	88,06 (8,02)**	996,22 (196,9)**	5,62	3169,82 (1373,73)	7,64	0,95	8,45
PB01AR	-1,45 (0,28)**	94,32 (9,09)**	775,35 (173,78)**	4,37	3512,76 (1687,81)	8,46	0,91	11,15
PB02AR	-1,5 (0,3)**	91,4 (7,02)**	607,23 (118,13)**	3,42	2637,55 (1205,18)	6,36	0,91	11,13
PB03AR	-1,02 (0,24)**	92,13 (9,89)**	404,7 (131,27)**	2,28	3504,11 (2783,23)	8,44	0,86	12,47
DV03AR	-1,69 (0,29)**	96,72 (5,53)**	547,21 (75,94)**	3,09	2013,95 (660,95)	4,85	0,95	8,75
PL07AR	-1,51 (0,28)**	93,92 (7,61)**	740,88 (143,6)**	4,18	3162,24 (1348,1)	7,62	0,94	9,48
VR01AR	-1,15 (0,19)**	105,54 (8,43)**	566,4 (124,32)**	3,19	3827,96 (1914,87)	9,22	0,95	8,45

<sup>1/</sup> Valores entre parênteses indicam o erro padrão.

\* e \*\* significativo a 5 e a 1% de probabilidade de erro respectivamente.

ns= não significativo.

**Tabela 10** - Parâmetros da equação, dose necessária para reduzir 50% e 90% da massa da parte aérea seca ( $GR_{50}$  -  $GR_{90}$ ), fator resistência (Fr), coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$ ) e raiz do quadrado médio do erro (RQME) para a variável massa da parte aérea seca ( $g\ pl^{-1}$ ) aos 28 dias após a aplicação de glyphosate em 44 populações de azevém. UTFPR – Pato Branco, 2017.

População	b	d	$GR_{50}$	Fr- $GR_{50}$	$GR_{90}$	Fr- $GR_{90}$	$R^2$	RQME
MR04AS	1,33 (0,17)**	2,98 (0,1)**	137,84 (12,3)**	-	722,25 (143,21)	-	0,92	0,29
MR05AS	4,09 (0,78)**	2,17 (0,07)**	207,62 (10,08)**	-	355,09 (42,30)	-	0,96	0,18
MR07AS	2,82 (0,57)**	1,84 (0,09)**	205,69 (17,48)**	-	448,74 (74,1)	-	0,96	0,15
MR12AS	1,39 (0,35)**	1,3 (0,11)**	167,04 (34,05)**	-	807,08 (295,44)	-	0,9	0,15
MR14AS	2,27 (0,44)**	1,84 (0,1)**	217,07 (21,44)**	-	570,68 (109,18)	-	0,96	0,15
CV03AS	2,51 (0,45)**	2,25 (0,1)**	178,93 (13,15)**	-	429,03 (72,6)	-	0,9	0,29
VT07AS	1,75 (0,25)**	2,31 (0,1)**	218,17 (21,66)**	-	768,21 (136,79)	-	0,95	0,19
RN01AS	1,89 (0,25)**	1,84 (0,07)**	165,56 (13,57)**	-	530,08 (85,38)	-	0,95	0,31
PL04AS	1,42 (0,32)**	1,46 (0,1)**	169,39 (29,64)**	-	795,56 (265,89)	-	0,94	0,12
PL05AS	1,92 (0,51)**	1,39 (0,12)**	220,19 (36,69)**	-	693,27 (222,48)	-	0,94	0,14
UV01AS	1,74 (0,19)**	3,49 (0,1)**	167,08 (10,22)**	-	590,68 (82,41)	-	0,96	0,26
Média	-	-	186,78	-	610,06	-	-	-
MR06AR	1,64 (0,33)**	1,73 (0,11)**	495,01 (83,18)**	2,65	1882,65 (574,01)	3,09	0,85	0,27
MR08AR	2,03 (0,31)**	2,46 (0,09)**	842,13 (80,44)**	4,51	2484,01 (440,93)	4,07	0,90	0,32
MR15AR	0,90 (0,07)**	4,08 (0,13)**	491,52 (53,96)**	2,63	5616,26 (1150,21)	9,21	0,85	0,5
MR16AR	2,16 (0,28)**	3,09 (0,09)**	660,17 (49,3)**	3,53	1830,05 (249,68)	3,00	0,93	0,33
MR18AR	1,34 (0,15)**	3,15 (0,13)**	286,10 (32,32)**	1,53	1473,17 (260,96)	2,41	0,93	0,31
MR20AR	1,59 (0,23)**	2,63 (0,11)**	704,03 (81,93)**	3,77	2792,72 (523,68)	4,58	0,87	0,38
MR22AR	1,15 (0,31)**	1,31 (0,13)**	377,82 (107,4)**	2,02	2561,49 (1373,65)	4,20	0,91	0,13
MR23AR	1,88 (0,21)**	3,22 (0,09)**	805,42 (63,45)**	4,31	2588,29 (349,65)	4,24	0,94	0,3
MR25AR	2,18 (0,47)**	2,15 (0,11)**	433,91 (48,18)**	2,32	1186,27 (248,5)	1,94	0,97	0,15
MR26AR	1,28 (0,1)**	4,05 (0,11)**	795,15 (66,24)**	4,26	4396,68 (610,22)	7,21	0,87	0,53
CV01AR	0,83 (0,14)**	2,29 (0,16)**	477,31 (129,25)**	2,56	6836,23 (2757,3)	11,21	0,94	0,18
CV02AR	1,57 (0,52)**	1,27 (0,13)**	303,07 (73,67)**	1,62	1224,5 (563,09)	2,01	0,88	0,17
CV04AR	0,93 (0,11)**	2,86 (0,14)**	255,62 (41,14)**	1,37	2709,41 (722)	4,44	0,84	0,39
CV05AR	3,49 (0,76)**	2,33 (0,09)**	587,85 (42,69)**	3,15	1102,45 (156,7)	1,81	0,98	0,17
VT02AR	1,25 (0,3)**	1,49 (0,13)**	357,16 (87,4)**	1,91	2068,4 (850,02)	3,39	0,90	0,17
VT03AR	4,56 (1,14)**	2,65 (0,08)**	846,94 (46,54)**	4,53	1371,79 (198,99)	2,25	0,96	0,23
VT04AR	1,44 (0,27)**	1,87 (0,12)**	360,3 (62,17)**	1,93	1663,21 (496,26)	2,73	0,92	0,2
VT05AR	2,18 (0,43)**	2,21 (0,1)**	569,37 (59,5)**	3,05	1557,12 (323,26)	2,55	0,97	0,17
VT06AR	1,47 (0,26)**	2,1 (0,12)**	391,03 (59,68)**	2,09	1749,76 (459,19)	2,87	0,97	0,14
IO01AR	3,04 (1,61)	1,28 (0,09)**	607,4 (84,74)**	3,25	1250,27 (535,73)	2,05	0,89	0,19
IO02AR	1,92 (0,18)**	4,43 (0,11)**	403,75 (23,74)**	2,16	1271,29 (135,01)	2,08	0,97	0,31
IO03AR	0,8 (0,07)**	3,69 (0,13)**	391,36 (53,06)**	2,10	6058,55 (1429,31)	9,93	0,90	0,35
IO04AR	1,18 (0,09)**	4,34 (0,13)**	325,13 (29,19)**	1,74	2102,25 (297,46)	3,45	0,94	0,39
RN02AR	1,66 (0,39)**	1,75 (0,1)**	925,94 (147,6)**	4,96	3473,09 (1024,32)	5,69	0,94	0,17
NP01AR	1,44 (0,19)**	3,09 (0,13)**	384,79 (40,65)**	2,06	1768,83 (335,67)	2,90	0,93	0,31
NP02AR	1,12 (0,56)**	0,65 (0,12)**	578,82 (336,52)	3,10	4104,72 (4182,36)	6,73	0,89	0,08
NP03AR	1,79 (0,31)**	2,35 (0,09)**	1027,9 (117,33)**	5,50	3513,91 (817,26)	5,76	0,94	0,21
PB01AR	1,33 (0,14)**	3,06 (0,1)**	886,95 (92,97)**	4,75	4628,44 (920,02)	7,59	0,87	0,39
PB02AR	1,47 (0,12)**	4,12 (0,1)**	788,72 (58,42)**	4,22	3518,41 (513,69)	5,77	0,92	0,44
PB03AR	1,2 (0,14)**	2,94 (0,12)**	493,79 (62,07)**	2,64	3080,62 (646,27)	5,05	0,91	0,31
DV03AR	1,78 (0,33)**	2,07 (0,1)**	696,88 (87,66)**	3,73	2401,33 (576,3)	3,94	0,92	0,23
PL07AR	1,66 (0,22)**	2,83 (0,09)**	928,08 (88,84)**	4,97	3476,33 (627,96)	5,70	0,95	0,22
VR01AR	1,38 (0,16)**	2,96 (0,12)**	479,16 (54,22)**	2,57	2353,46 (444,41)	3,86	0,96	0,23

<sup>1/</sup> Valores entre parênteses indicam o erro padrão.

\* e \*\* significativo a 5 e a 1% de probabilidade de erro respectivamente.

ns= não significativo.

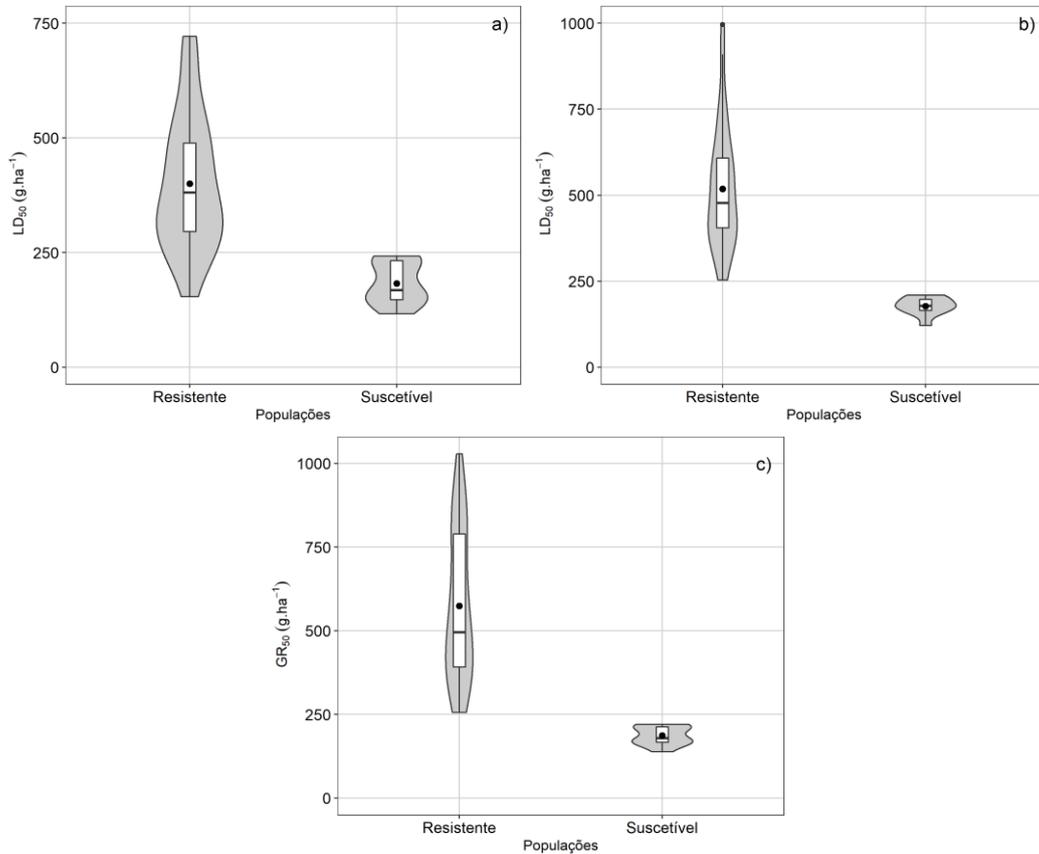
Na avaliação de controle realizada aos 14 DAA, o  $LD_{50}$  das populações suscetíveis situou-se entre 116,2 e 242,02 g.e.a.  $ha^{-1}$  e o das populações resistentes entre 154,07 e 701,88 g.e.a.  $ha^{-1}$ , proporcionando valores de Fr entre 0,84 e 7,37 (Tabela 8). Para a avaliação de controle aos 28 DAA, o  $LD_{50}$  das populações suscetíveis variou entre 121,00 e 209,65 g.e.a.  $ha^{-1}$  e os das populações resistentes entre 253,44 e 909,38 g.e.a.  $ha^{-1}$ , resultando

em Fr -  $LD_{50}$  entre 1,43 e 5,13 (Tabela 9). O  $LD_{90}$  obtido apartir do controle aos 28 DAA de todas as populações suscetíveis foram inferiores a 720 g.e.a.  $ha^{-1}$ , situando-se entre 278,21 e 645,03 g.e.a.  $ha^{-1}$ . Dentre as populações resistentes o  $LD_{90}$  variou entre 819,64 e 6164,88 g.e.a.  $ha^{-1}$ , o que proporcionou valores de Fr -  $LD_{90}$  entre 1,98 e 14,86. O  $GR_{50}$  das populações suscetíveis situou-se entre 137,84 e 220,19 g.e.a.  $ha^{-1}$  e das populações resistentes entre 286,1 e 928,08 proporcionando Fr -  $GR_{50}$  entre 1,37 e 5,50 (Tabela 10). O  $GR_{90}$  das populações suscetíveis variou de 355,09 a 807,08 g.e.a.  $ha^{-1}$  e das populações resistentes de 1102,45 até 6836,23 g.e.a.  $ha^{-1}$ . Os valores de Fr -  $GR_{90}$  deste periodo se situaram entre 1,81 e 11,21.

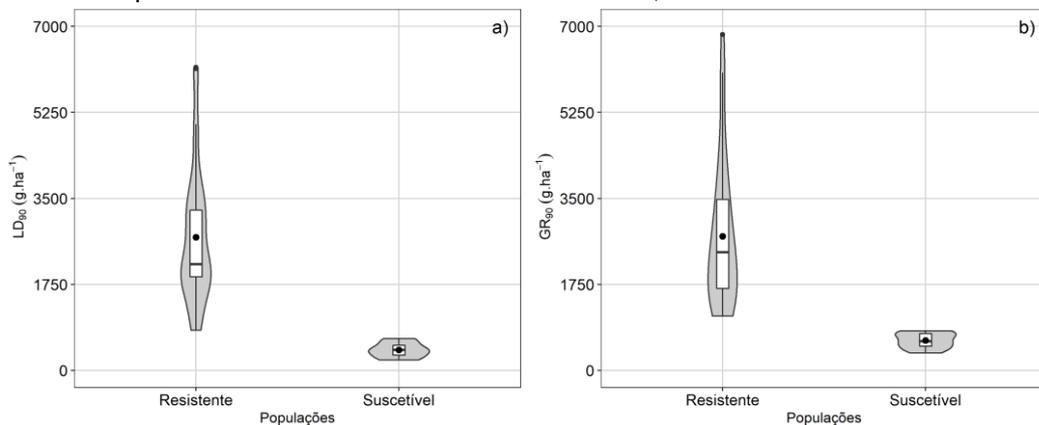
As populações PL07AR, PB01AR, RN02AR e NP03AR apresentaram os maiores valores de  $LD_{50}$  (740,88; 775,35; 909,38 e 996,22 g.e.a.  $ha^{-1}$  respectivamente) em controle aos 28 DAA e  $GR_{50}$  (928,08, 886,95, 925,94 e 1027,9 g.e.a.  $ha^{-1}$  respectivamente) e consequentemente os maiores valores de Fr -  $LD_{50}$  (4,18, 4,37, 5,13, 5,62 respectivamente) e Fr -  $GR_{50}$  (4,97, 4,75, 4,96 e 5,50 respectivamente).

As populações resistentes possuem  $LD_{50}$  e  $GR_{50}$  distribuidas principalmente entre 300 e 500 g.e.a.  $ha^{-1}$  (45% para ambos respectivamente) e  $LD_{90}$  e  $GR_{90}$  (39 e 30% respectivamente) entre 1500 e 2500 g.e.a.  $ha^{-1}$  (Figuras 10 e 11). Os demais valores se distribuem fracionadamente pelo eixo.

**Figura 10** - Diagrama de violino combinado com diagrama de caixa para demonstrar a distribuição dos valores de  $LD_{50}$  e  $GR_{50}$  das populações suscetíveis e resistentes ao glyphosate quando avaliado o controle aos 14 (a) e 28 (B) dias após a aplicação (DAA) e MPAS (C) aos 28 (DAA). O ponto representa a média geométrica das observações enquanto que a linha representa a mediana. UTFPR – Pato Branco, 2017.



**Figura 11** - Diagrama de violino combinado com diagrama de caixa para demonstrar a distribuição dos valores de  $LD_{90}$  e  $GR_{90}$  das populações suscetíveis e resistentes ao glyphosate quando avaliado o controle aos 28 (a) e MPAS (C) aos 28 dias após a aplicação. O ponto representa a média geométrica das observações enquanto que a linha representa a mediana. UTFPR – Pato Branco, 2017.



#### 4.1.1 Discussão

Afim de caracterizar a resposta ao glyphosate de populações de azevém das Regiões Sul e Sudoeste do Paraná, 44 populações foram estudadas. Os valores de  $LD_{50}$  e  $GR_{50}$  das populações suscetíveis se situaram entre 121,0 e 220,19 g.e.a. ha<sup>-1</sup> e estão de acordo com o observado na literatura para a espécie (JASIENIUK *et al.*, 2008; SALAS *et al.*, 2012; SALAS *et al.*, 2015; FERNÁNDEZ-MORENO *et al.*, 2017; GONZÁLEZ-TORRALVA *et al.*, 2012; KARN *et al.*, 2018). Os valores de  $LD_{90}$  destas populações foram inferiores a 720 g.e.a. ha<sup>-1</sup>, confirmando que a dose de rótulo foi eficiente para o controle destas plantas.

De modo geral, os valores de  $LD_{50}$  e  $GR_{50}$  observados não foram elevados e se situaram principalmente entre 300 e 1000 g.e.a. ha<sup>-1</sup> sendo que em uma única população foi superior a 1000 g.e.a. ha<sup>-1</sup> ( $GR_{50}$  da NP03AR). Diferentes estudos avaliando a resistência de azevém ao glyphosate, demonstraram que comumente os valores de  $GR_{50}$  se situam próximo a 1000 g.e.a. ha<sup>-1</sup> e já foram detectados valores de até 9000 g.e.a. ha<sup>-1</sup> (KARN *et al.*, 2018). Os Fr baseados em  $LD_{50}$  ou  $GR_{50}$  das populações estudadas se situaram entre 1,35 e 5,62 e estão de acordo ao observado em outros estudos para a espécie, os quais comumente variam de 2 a 15 (JASIENIUK *et al.*, 2008; PEREZ-JONES *et al.*, 2005; KARN *et al.*, 2018). De fato, não há consenso quanto a valores de FR que sejam considerados como discriminatórios para descrever o problema da resistência, sendo que para determinados mecanismos de ação herbicidas e espécies daninhas, podem variar em centenas ou milhares de vezes (BURGOS *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2012; HAN, *et al.* 2012). Em específico ao glyphosate, considerando diferentes espécies, estes valores comumente podem variar de 2 a 14 (ALCÁNTARA-DE LA CRUZ *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2019; DE CARVALHO *et al.*, 2012; LORENTZ *et al.*, 2014; WIERSMA *et al.*, 2015; NGO *et al.*, 2018; ALARCÓN-REVERTE *et al.*, 2015; ALARCÓN-REVERTE *et al.*, 2013; POWLES e PRESTON, 2006). Todavia, sabe-se que níveis de resistência baixos, acarretam aumento dos custos de produção da cultura, além de que as

plantas resistentes remanescentes após a aplicação do herbicida, estarão competindo por recursos e comprometendo o potencial produtivo da cultura.

A alta variabilidade de resposta dentro de um grande conjunto amostral, conforme observado no presente estudo, é uma característica esperada. A intensidade de seleção das populações, ou seja, a pressão de seleção imposta pelo glyphosate é variável para cada lavoura. Avaliando populações de azevém da Califórnia, Jaseniuk *et al.* (2008) observou que dentre 118 populações, 54 apresentavam ao menos uma planta sobrevivente e 24 apresentavam 95% das plantas resistentes. Avaliando a frequência de indivíduos resistentes em 15 populações de azevém também da Califórnia, foi observado que dentro de cada população pode variar de 10 a 90% (KARN e JASENIUK, 2017). Em 15 populações de *L. rigidum* do Oeste Europeu, o Fr das populações variou de 1 a 18 (FERNÁNDEZ-MORENO *et al.*, 2017) e em 11 populações de *Kochia scoparia* da área central dos EUA, o Fr variou de 1 a 14 (WIERSMA *et al.*, 2015). Em 44 populações de *Ipomoea* spp da Região Sudoeste do Paraná, o fator tolerância ao glyphosate situou-se entre 1 e 34 (PAZUCH *et al.*, 2017). A seleção direcional positiva quando há aplicação de herbicidas tem sido sugerida como mecanismo selecionador de indivíduos tolerantes ou resistentes a herbicidas (BAUCOM e MAURICIO, 2004).

Na região onde foram realizadas as coletas das amostras de sementes, o uso do glyphosate de forma mais intensiva se iniciou juntamente com o alastramento do plantio direto a partir do fim da década de 1980. Mesmo antes da liberação de culturas resistentes ao glyphosate em 2005 no estado do Paraná, alguns agricultores já relatavam a dificuldade de controle de azevém com o glyphosate. Portanto, o processo de seleção das plantas na região já ocorre há mais de 40 anos, sendo intensificando nos últimos 15 anos. É importante destacar que em plantas de polinização cruzada, como é o caso do azevém, pode haver o fluxo de pólen entre populações vizinhas e isso contribui com o aumento da variabilidade genética dos indivíduos e conseqüentemente a variabilidade de resposta a herbicidas. Estudos com plantas do gênero *Lolium* demonstraram que o pólen viável pode chegar até 3000 km da planta mãe (BUSI *et al.*, 2008).

A caracterização da resistência por meio de curvas dose resposta permitem a melhor compreensão do comportamento das populações perante o aumento das doses do herbicida. O LD<sub>50</sub>/GR<sub>50</sub> possuem caracter científico e permitem a comparação entre populações na literatura, enquanto o LD<sub>90</sub>/GR<sub>90</sub> possuem caracter técnico e são importantes para demonstrar a dose necessária para o controle das plantas a campo. Os valores de LD<sub>90</sub> apresentaram elevada variabilidade (819,64 a 6164,88 g.e.a. ha<sup>-1</sup>) e em algumas populações como a MR20AR e CV01AR, foram necessárias doses 15 vezes superiores a das populações suscetíveis para proporcionar o mesmo nível de controle. Na literatura há diversos estudos que avaliam a resposta de um grande número de populações supostamente resistentes a herbicidas, todavia, comumente estes caracterizam apenas se há presença ou ausência de plantas resistentes, enquanto que análises de curvas dose resposta comumente são realizadas com poucas populações (JASENIUK *et al.*, 2008; KARN *et al.*, 2018; FERNÁNDEZ-MORENO *et al.*, 2017). Conforme observado no presente estudo, há populações com baixo nível de resistência as quais podem ser mascaradas sem uma avaliação precisa.

A análise por curvas de resposta a doses do herbicida permitiu identificar populações com distintos níveis de resistência, no qual baseado com os resultados observados na literatura não podem ser considerados elevados, com Fr se situando principalmente entre 2 e 4. Em áreas em que é detectado o início da resistência, é recomendado que os agricultores e técnicos responsáveis desencadeiem estratégias de manejo que incluam sistemas integrados, tais como métodos culturais, rotação e associação de herbicidas com distintos e mecanismos de ação, a fim de evitar a evolução destes casos de resistência a níveis superiores. Para as áreas de lavoura em que a resistência já esta disseminada, é necessário a adoção de táticas de manejo mais aprimoradas, além das já supracitadas. Neste caso, os responsáveis devem estar mais atentos aos hábitos de desenvolvimento da espécie, realizando o manejo das plantas em estádios mais oportunos, antes destas iniciarem o estágio reprodutivo ou até mesmo antes da emergência das plântulas. Em ambas as situações, é importante que os responsáveis pelas áreas também tomem cuidado com o

manejo, especialmente com a intensidade dos herbicidas alternativos ao glyphosate utilizados, a fim de reduzir a pressão de seleção com os novos mecanismos, evitando que as populações evoluam para a resistência múltipla, assim como já vem sendo observado em populações desta espécie e de outras em diferentes lavouras da Região Sul do Brasil.

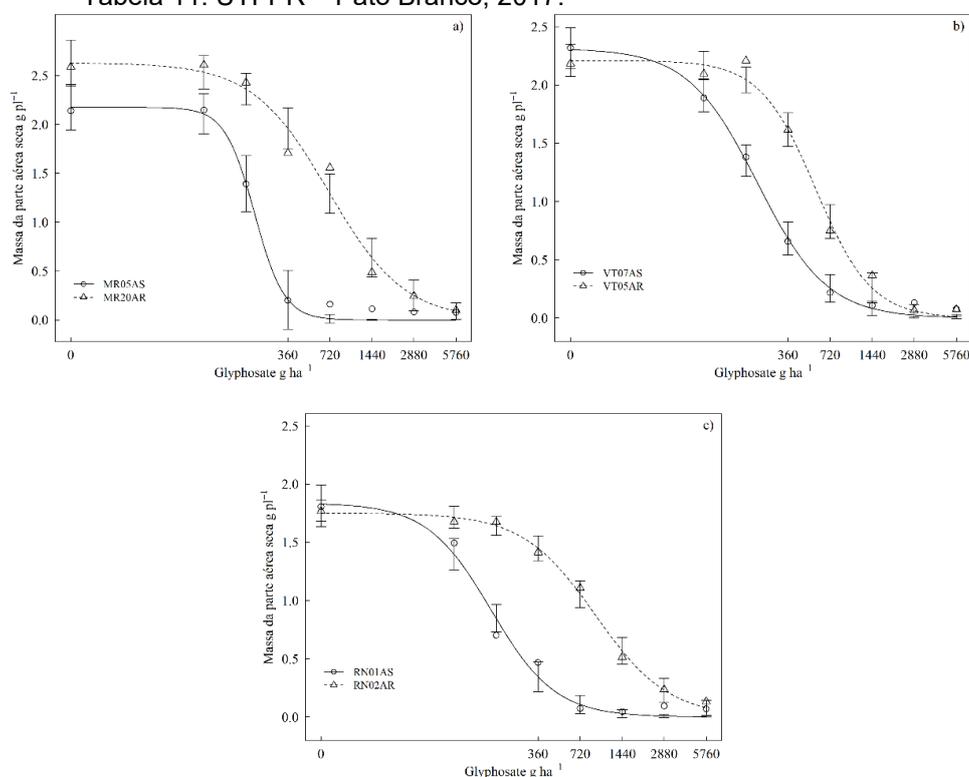
## 4.2 ESTUDO MOLECULAR DO MECANISMO RELACIONADO AO LOCAL DE AÇÃO ENVOLVIDO NA RESISTÊNCIA DE AZEVÉM AO GLYPHOSATE

### 4.2.1 Resultados

#### 4.2.1.1 Dose resposta

O ensaio de curva dose resposta indicou resposta diferencial entre as três populações resistentes ao glyphosate. O nível de injúria foi proporcional ao incremento das doses de glyphosate, tanto para as populações S quanto R, todavia, as populações R foram menos sensíveis (Figura 12). A partir dos valores de  $GR_{50}$  das populações resistentes e suscetíveis (Tabela 11) foram calculados os Fatores de Resistência (Fr), de acordo com o par pertencente ao mesmo local de coleta. Os Fr's foram de 3,39, 2,60 e 5,59 respectivamente para MR20AR, VT05AR e RN02AR (Tabela 11).

**Figura 12** - Massa da parte aérea seca aos 28 dias após a aplicação de glyphosate em seis populações de azevém oriundas da região Sudoeste do Paraná. Os pontos indicam a média de quatro repetições enquanto as barras representam o erro padrão da média dos valores estimados pela equação. Os parâmetros são observados na Tabela 11. UTFPR – Pato Branco, 2017.



**Tabela 11** - Parâmetros da equação, R<sup>2</sup> ajustado, raiz do quadrado médio do erro (RQME) e dose de glyphosate requerida para proporcionar 50% de injúria das plantas (*GR*<sub>50</sub>) de seis populações de azevém. FR indica o fator resistência. UTFPR – Pato Branco, 2017.

População	Parâmetros			FR	R <sup>2</sup>	RQME
	b	d	<i>GR</i> <sub>50</sub>			
MR05AS	4.09 (0.78)**	2.17 (0.07)**	207.62 (10.08)**	-	0.96	0.18
MR20AR	1.59 (0.23)**	2.63 (0.11)**	704.03 (81.93)**	3.39	0.87	0.38
VT07AS	1.75 (0.25)**	2.31 (0.10)**	218.17 (21.66)**	-	0.95	0.19
VT05AR	2.18 (0.43)**	2.21 (0.10)**	569.37 (59.50)**	2.60	0.97	0.17
RN01AS	1.89 (0.25)**	1.84 (0.07)**	165.56 (13.57)**	-	0.95	0.31
RN02AR	1.66 (0.39)**	1.75 (0.10)**	925.94 (147.6)**	5.59	0.94	0.17

\* significativos a 1 %.

#### 4.2.1.2 Sequenciamento do gene da EPSPs

Foi sequenciado um fragmento de 301pb da EPSPs, que incluiu as posições 102 e 106 da sequência da proteína, na qual comumente são

associadas as mutações que resultam na resistência das plantas ao glyphosate. As sequências de aminoácidos obtidas foram comparadas com o acesso do GenBank DQ153168 de azevém. Nenhuma das populações resistentes apresentaram substituição de aminoácidos nestas posições (Tabelas 12 e 13). SNPs (polimorfismo de nucleotídeo simples) foram observados na posição 103 das populações MR05AS, VT07AS, VT05AR e RN01AS todavia sem alterar o aminoácido. Todas as populações analisadas demonstraram substituição de uma C/T na posição 133 da EPSPs, o que caracteriza uma alteração de uma timina por uma isoleucina e por ocorrer em ambas as populações (suscetível e resistente), não é possível caracterizá-la como responsável pela resistência ao glyphosate.

**Tabela 12** - Sequência parcial de nucleotídeos do cDNA da EPSPs isolado de populações de azevém suscetíveis e resistentes ao glyphosate. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.

Posição	100	101	102	103	104	105	106	107	108
Aminoácido	A	G	T	A	M	R	P	L	T
DQ153168	G C T	G G A	A C T	G C A	A T G	C G G	C C A	T T G	A C G
MR05AS	G C T	G G A	A C T	G C G	A T G	C G G	C C A	T T G	A C G
MR20AR	G C T	G G A	A C T	G C A	A T G	C G G	C C A	T T G	A C G
VT07AS	G C T	G G A	A C T	G C G	A T G	C G G	C C A	T T G	A C G
VT05AR	G C T	G G A	A C T	G C G	A T G	C G G	C C A	T T G	A C G
RN01AS	G C T	G G A	A C T	G C G	A T G	C G G	C C A	T T G	A C G
RN02AR	G C T	G G A	A C T	G C A	A T G	C G G	C C A	T T G	A C G

**Tabela 13** - Sequencia parcial de nucleotídeos do cDNA da EPSPs isolada de populações de azevém suscetíveis e resistentes ao glyphosate. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.

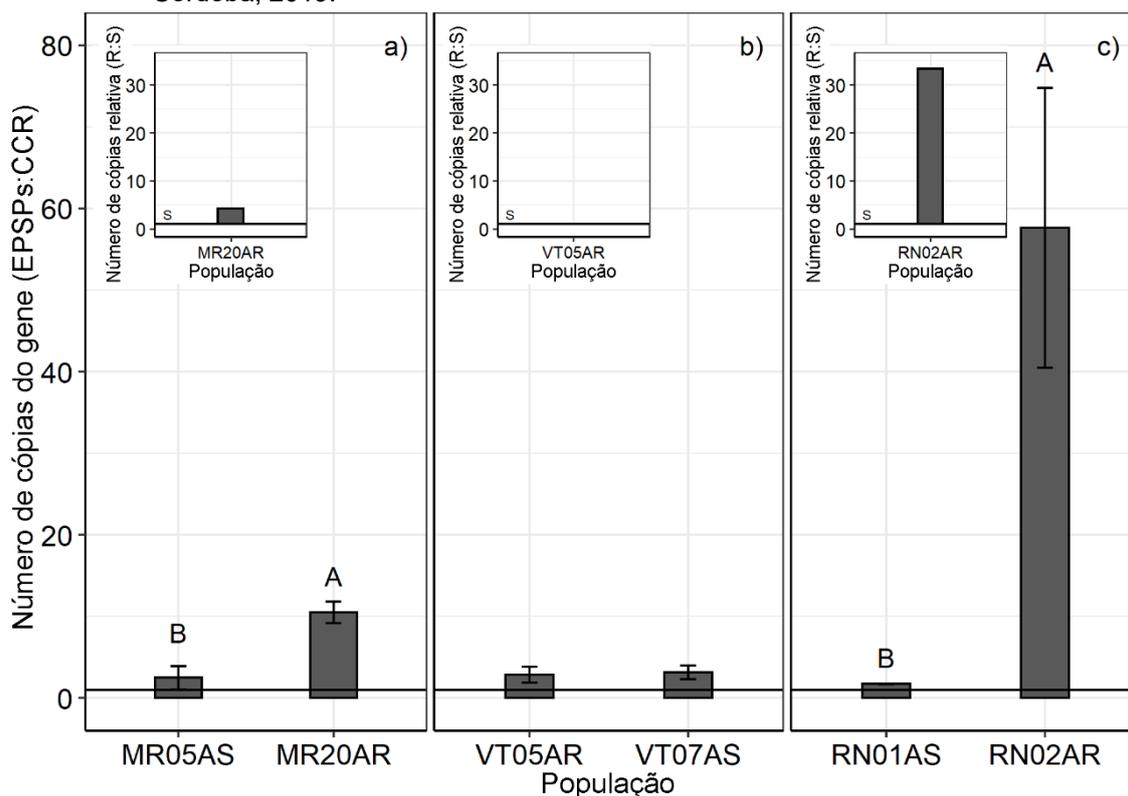
Posição	130	131	132	133	134	135	136
Aminoácido	E	R	P	T/I*	G	D	L
DQ153168	G A G	C G A	C C T	A C C	G G T	G A C	T T A
MR05AS	G A G	C G A	C C T	A T C	G G T	G A C	T T A
MR20AR	G A G	C G A	C C T	A T C	G G T	G A C	T T A
VT07AS	G A G	C G A	C C T	A T C	G G T	G A C	T T A
VT05AR	G A G	C G A	C C T	A T C	G G T	G A C	T T A
RN01AS	G A G	C G A	C C T	A T C	G G T	G A C	T T A
RN02AR	G A G	C G A	C C T	A T C	G G T	G A C	T T A

#### 4.2.1.3 Número de cópias do gene da EPSPs

As populações suscetíveis apresentaram entre 1 e 3 vezes maior número de cópias da EPSPs em relação a CCR (Cinnamoyl-CoA-reductase) enquanto que as populações resistentes apresentaram entre 3 e 57 vezes maior

número de cópias em relação a CCR (Figura 13). As populações VT07AS (Suscetível) e VT05AR (Resistente) não diferiram quanto ao número de cópias do gene. A população RN02AR apresentou número de cópias 33 vezes superior ao da população RN01AS, enquanto que a população MR20AR apresentou número de cópias 4 vezes superior à da população MR05AS.

**Figura 13** - Número de cópias do gene da EPSPs relativo a CCR (Cinnamoyl-CoA-reductase) em populações de azevém suscetíveis e resistentes ao glyphosate. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.

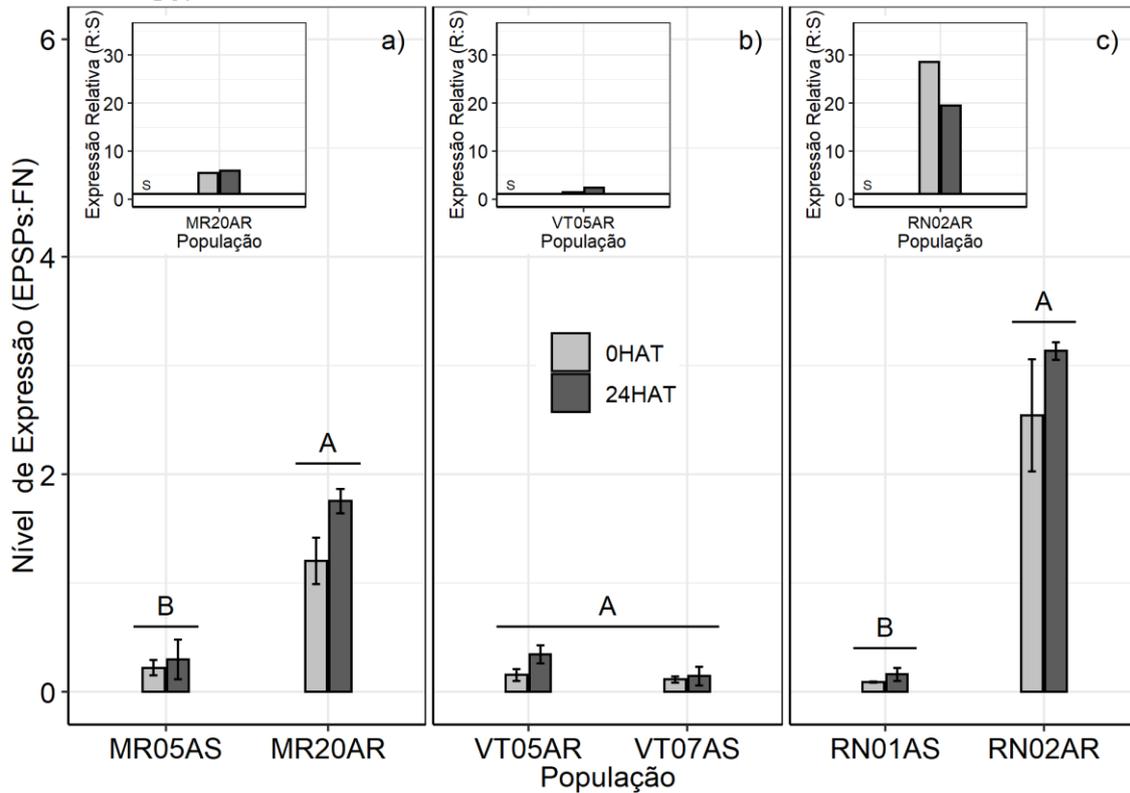


#### 4.2.1.4 Expressão do gene da EPSPs

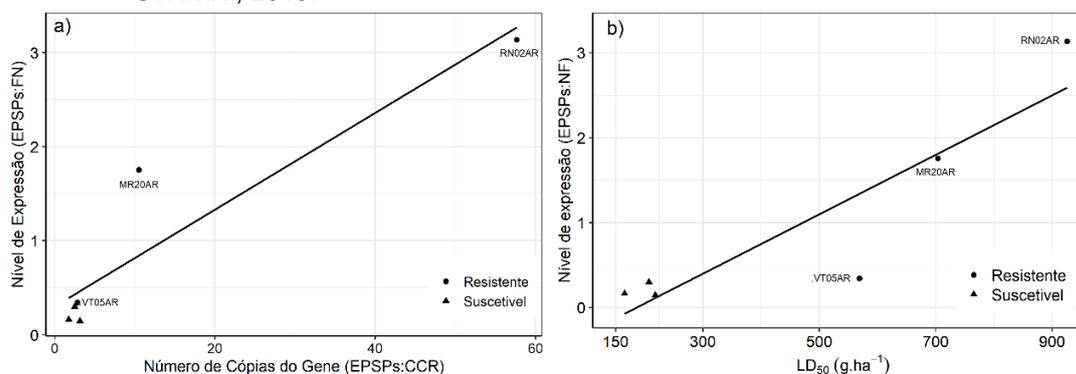
Tanto para as populações suscetíveis quanto para as resistentes, não foi constatado aumento da expressão da EPSPs após a aplicação do glyphosate (24 HAT) em comparação à expressão anterior à aplicação do herbicida (0 HAT) ( $p \leq 0.05$ ). Portanto os dados foram agrupados para se obter a expressão relativa de cada população resistente em comparação ao respectivo par suscetível (Figura 14). Duas das três populações resistentes estudadas apresentaram maior expressão da EPSPs em relação às suscetíveis do mesmo

município de coleta. Os níveis de expressão das populações MR20AR e RN02AR foram 5,6 e 23,9 vezes superiores, respectivamente, às populações MR05AS e RN01AS, enquanto que as populações VT07AS e VT05AR não diferiram entre si. A expressão do gene da EPSPs foi positivamente correlacionada com o número de cópias do gene ( $R^2 = 0,86$ ) e com o  $GR_{50}$  das populações ( $R^2 = 0,81$ ) (Figura 15).

**Figura 14** - Nível de expressão da EPSPs ( $\times 10^5$ ), antes (0 horas) e após (24 horas) a aplicação de glyphosate (HAT) em populações de azevém suscetível e resistente ao glyphosate. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.



**Figura 15** - Relação entre: a) Nível de expressão da EPSPs (EPSPs:FN  $\times 10^5$ ) (24 HAT) e número de cópias do gene da EPSPs (EPSPs:CCR) ( $R^2 = 0,86$ ) e b) Nível de expressão da EPSPs (EPSPs:FN  $\times 10^5$ ) (24 HAT) e dose de glyphosate necessária para proporcionar 50% do injúria ( $LD_{50}$ ) ( $R^2 = 0,81$ ) em plantas azevém. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.



#### 4.2.2 Discussão

A fim de estudar o envolvimento do mecanismo relacionado ao local de ação, em populações de azevém resistentes ao glyphosate, foram conduzidos diferentes estudos para verificar se há presença de substituição de aminoácidos, amplificação e expressão do gene da EPSPs. A análise de curva de dose resposta demonstrou que as populações resistentes possuem níveis distintos de resistência ao glyphosate, em que o fator resistência (FR) se situa entre 2,60 e 5,59 em relação à população suscetível do respectivo local de coleta. Estes valores de FR estão de acordo com os relatados em outras populações de azevém resistentes ao glyphosate do Brasil (VARGAS *et al.* 2016). Todavia, em populações resistentes nos Estados Unidos já foram registrados FR de até 15 (JASIENIUK *et al.*, 2008). O FR é dependente do mecanismo de resistência e valores elevados sugerem que mais de um mecanismo pode estar envolvido. Para algumas espécies, valores baixos de FR são associados com mecanismos relacionados ao local de ação principalmente decorrentes de substituições únicas de aminoácidos na sequência codificadora da proteína da EPSPs (SAMMONS e GAINES, 2014).

Nenhuma das populações resistentes estudadas apresentaram substituição de aminoácidos dentro da região sequenciada. Estudos realizados com populações de azevém resistentes ao glyphosate demonstraram que,

quando presente, a substituição ocorre na posição 106 do gene da EPSPs, de uma prolina para alanina ou serina (PEREZ-JONES *et al.*, 2007; KARN e JASIENIUK, 2017). Em outras plantas da família Poaceae, como *Lolium perenne*, *L. rigidum*, *Eleusine indica*, *Leptochloa virgata* e *Echinochloa colona*, foram observadas substituições de aminoácidos nas posições 102, 106 e 310 do gene da EPSPs (KAUNDUN *et al.*, 2011; ALARCÓN-REVERTE *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2015; ALCÁNTARA-DE LA CRUZ *et al.*, 2016; KARN *et al.*, 2017). Foi sugerido que alteração de aminoácidos não é o principal mecanismo envolvido na resistência de *Lolium* spp. ao glyphosate (WAKELIN e PRESTON 2006), sendo comum encontrar populações resistentes ao herbicida que não possuam substituições. Neste estudo, foi observado a substituição de treonina por uma isoleucina na posição 133, a qual foi observada em ambas as populações (suscetível e resistente) não podendo ser responsável pela resistência ao glyphosate. Este fato também foi observado em populações de *L. perenne* na Argentina (YANNICCARI *et al.*, 2017).

O aumento do número de cópias do gene da EPSPs foi observado nas populações MR20AR (10,5x) e RN02AR (57,6x) em relação as respectivas populações MR07AS e RN01AS, mas não na população VT05AR em relação a VT07AS. A variação do número de cópias do gene da EPSPs observada neste estudo, está de acordo com o realizado com populações de azevém do Arkansas (SALAS *et al.*, 2012; SALAS *et al.*, 2015) no qual plantas resistentes apresentavam número de cópias que superaram em 100x o das plantas suscetíveis. De fato, estudos com diferentes espécies de plantas daninhas, tais como *Amaranthus palmeri*, *L. multiflorum*, *Chloris truncata* e *Kochia scoparia* têm demonstrado que o aumento do número de cópias do gene da EPSPs possui efeito aditivo com o nível de resistência ao glyphosate (GAINES *et al.*, 2010; SALAS *et al.*, 2015; JUGULAM *et al.*, 2014; NGO *et al.*, 2018). O gene da EPSPs, normalmente possui baixo número de cópias em plantas (XU *et al.*, 2002; THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE, 2009) e a variação do número de cópias deste gene pode estar relacionada a diferentes mecanismos, tais como os elementos transponíveis e eventos de duplicação em tandem (PATTERSON *et al.*, 2017; POWLES, 2010). Elementos transponíveis e a presença de helitrons

foram associados com a amplificação do gene da EPSPs em *Amaranthus palmeri* (MOLIN *et al.*, 2017). O aumento do número de cópias do gene não está relacionado ao nível de ploidia em *Amaranthus palmeri* (CULPEPPER *et al.*, 2006). É importante considerar que mecanismos relacionados ao local de ação podem representar impactos distintos no processo de evolução da resistência. Apesar da substituição de aminoácidos no sítio de ação enzimático muitas vezes resultar em menores níveis de resistência, a sua herdabilidade é mais estável de acordo com o avanço de gerações, comparativamente à variação do número de cópias do gene (GAINES *et al.*, 2010). Isto ocorre principalmente em função dos mecanismos de reparação do DNA, já que foi proposto que, na ausência de pressão de seleção pelo herbicida com o avanço de gerações, é provável que o número de cópias normalize (GAINES *et al.*, 2010).

O número de cópias da EPSPs apresentou correlação positiva com a expressão do gene (0,86), sugerindo que as cópias adicionais produzem transcritos funcionais nas populações resistentes de azevém, o que está de acordo com o que foi observado com plantas de *Kochia scoparia*, *Eleusine indica* e *Amaranthus tuberculatus* (CHEN *et al.*, 2015; DILLON *et al.*, 2017; WIERSMA *et al.*, 2015). De fato, o aumento do número de cópias nem sempre possui relação direta com a expressão gênica. Foi observado que, apesar de plantas resistentes de *Bromus diandrus* apresentarem alto número de cópias do gene da EPSPs, a expressão foi baixa (MALONE *et al.*, 2016). A expressão do gene está relacionada com a atividade dos mecanismos tradutores, os quais poderão ou não aumentar a produção de transcritos em relação ao número de cópias do gene.

Em nenhuma das populações estudadas (S ou R) foi constatada diferença de expressão da EPSPs em função dos períodos após aplicação. Fato semelhante foi observado em plantas de *Leptochloa virgata* e *Amaranthus tuberculatus* (ALCÁNTARA-DE LA CRUZ *et al.*, 2016; LORENTZ *et al.*, 2014). Isto sugere que a aplicação do glyphosate não proporciona efeito regulatório da EPSPs nas plantas de azevém estudadas, mas sim que as plantas já estão condicionadas devido ao maior número de cópias do gene.

A expressão do gene da EPSPS foi positivamente correlacionada com a variação do número de cópias do gene. Aumento da expressão foi observada nas populações MR20AR (5.6) e RN02AR (23.9) em relação as respectivas populações MR07AS e RN01AS, mas não na população VT05AR comparativamente a VT07AS. Também foi constatada correlação positiva entre a expressão do gene (24HAT) e o  $GR_{50}$  das populações (0,81). O aumento da expressão da EPSPs em populações resistentes também tem sido observado em populações de *L. multiflorum* e *L. perenne*, onde nível de expressão das populações resistentes foi de 15 a 23x superior ao das populações suscetíveis (FERNÁNDEZ-MORENO *et al.*, 2017; YANNICCARI *et al.*, 2017). Em uma população de *Amaranthus* spp. resistente ao glyphosate a expressão do gene da EPSPs foi 35x superior à da população suscetível (GAINES *et al.*, 2010, NANDULA *et al.*, 2014). Estudos tem demonstrado que a expressão do gene da EPSPs é positivamente correlacionada com a atividade da enzima EPSPs (FERNÁNDEZ-MORENO *et al.*, 2017) e inversamente proporcional ao acúmulo do ácido chiquímico (MOHSENI-MOGHADAM *et al.*, 2013). A manutenção ou aumento da produção da proteína dá continuidade à rota que metaboliza o ácido chiquímico proporcionado a sobrevivência das plantas mesmo com a elevação das doses do herbicida.

Em conjunto, estes resultados demonstram que o aumento da expressão do gene da EPSPs devido à amplificação gênica são mecanismos relacionados com a resistência das populações MR20AR e RN02AR ao glyphosate, mas não da população VT05AR. De fato, pela ausência de mecanismo relacionado ao local de ação envolvido na resistência da população VT05AR ao glyphosate, é provável que o mecanismo de resistência desta população seja não relacionado ao local de ação do herbicida. Diversos outros mecanismos não relacionados ao local de ação podem estar envolvidos na resistência de azevém a herbicidas, como reduzida absorção e translocação aos pontos meristemáticos, devido ao sequestro vacuolar (FERREIRA *et al.*, 2006; GE *et al.*, 2012, FERNÁNDEZ-MORENO *et al.*, 2017).

Estudos já confirmaram a redução da translocação do herbicida como mecanismo de resistência em populações de azevém do Brasil

(FERREIRA *et al.*, 2006), todavia, ainda não havia sido caracterizado o aumento do número de cópias e a superexpressão do gene da EPSPs em populações dessa espécie no Brasil. Azevém é uma espécie de polinização cruzada, o que facilita a troca de material genético e favorece o compartilhamento de mecanismos de resistência entre populações. É importante destacar que as populações utilizadas no presente estudo foram coletadas em propriedades localizada a uma distância máxima de 40 km entre si. Evidencia-se, portanto, que dentro de uma pequena região podem estar presentes populações com distinta resposta ao herbicida, determinada por distintos mecanismos de resistência, e que estes podem não estar relacionados. Portanto, estratégias de manejo devem ser adotadas para evitar o fluxo gênico entre populações e a combinação entre diferentes mecanismos resistência.

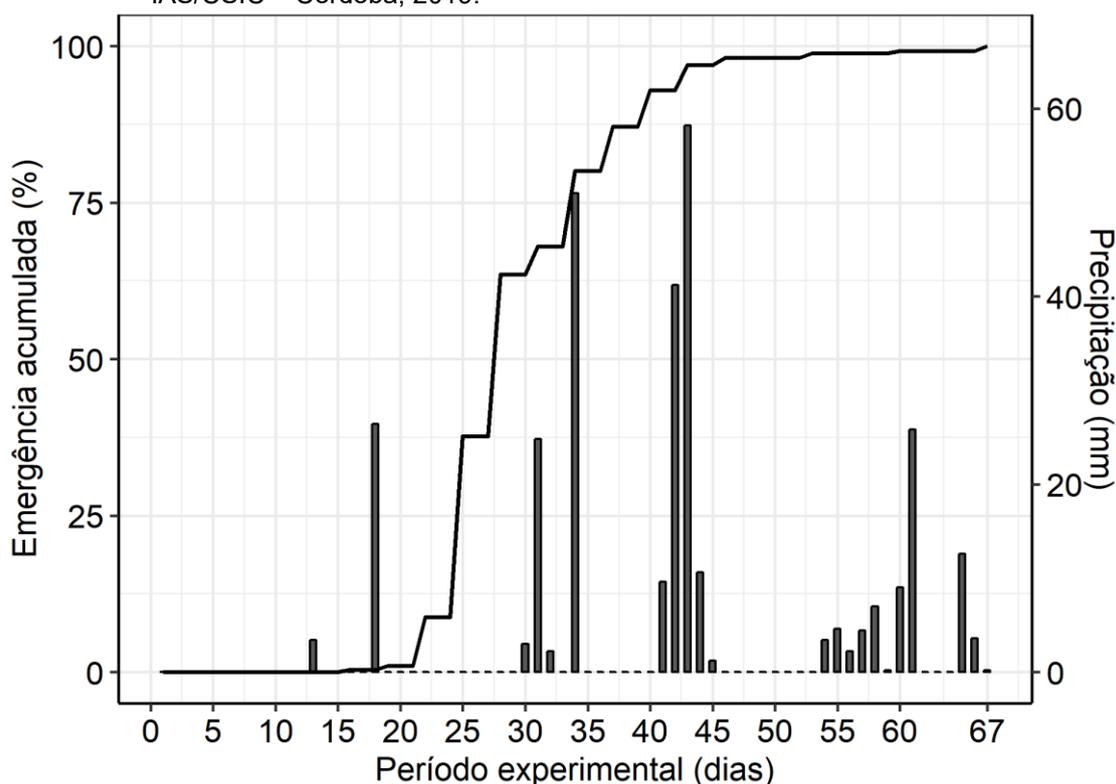
### 4.3 DEMOGRAFIA DE AZEVÉM SUSCETIVEL E RESISTENTE AO GLYPHOSATE

#### 4.3.1 Resultados

##### 4.3.1.1 Emergência

A taxa média de emergência de plântulas das populações suscetíveis e resistentes foi de 72,3% ( $\pm 0,4$ ; desvio padrão) e 72,8% ( $\pm 0,5$ ), respectivamente. Como não foram observadas diferenças ( $p < 0,05$ ), os dados foram agrupados. Portanto, a taxa de emergência global observada foi de 72,5% ( $\pm 0,4$ ). A emergência iniciou aos 16 dias após a semeadura de azevém, atingindo 50% da emergência total entre 25 e 28 dias e 90% aos 37 dias após a semeadura (Figura 16).

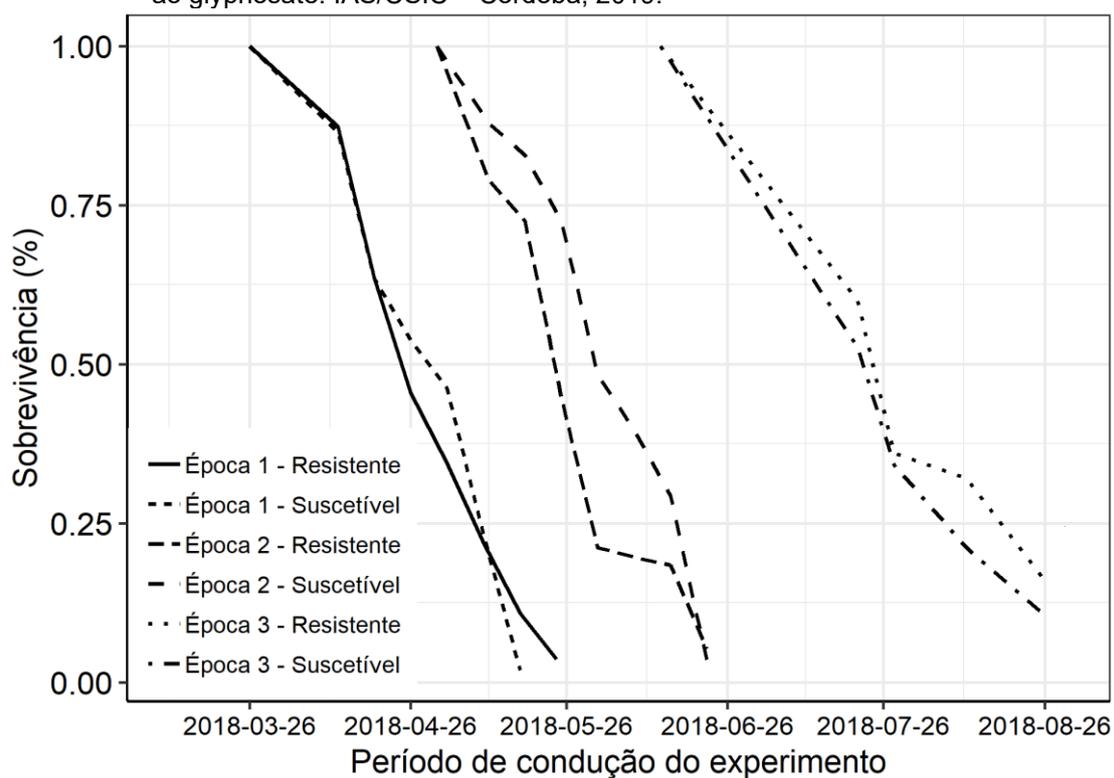
**Figura 16** - Precipitação (■) e emergência acumulada (—), de populações de azevém. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.



#### 4.3.1.2 Sobrevivência de plântulas em diferentes cohorts e populações

Os dois primeiros *cohorts* da população suscetível apresentaram taxas de sobrevivência similares, com valores situando-se de 0,02 e 0,03, resultados semelhantes foram observados com a população resistente, no qual a taxa de sobrevivência situou-se de 0,04 a 0,05 (Figura 17 e Tabela 14). Em cada população, o terceiro *cohort* apresentou taxa de sobrevivência superior aos dois primeiros, sendo de 0,10 e 0,16, respectivamente, para as populações suscetível e resistente. A análise de log-rank confirma a diferença significativa entre as curvas de sobrevivência ( $X^2 = 32,86$ ,  $gl = 5$ ,  $p = <0,001$ ; Figura 17), com maior sobrevivência das plantas do terceiro *cohort* em comparação aos dois primeiros (Holm-Sidak test.  $p \leq 0,05$ ; Tabela 15). Destaca-se que dentro de um mesmo *cohort*, em nenhum caso foi observada diferença entre as populações suscetível e resistente ao glyphosate ( $p \leq 0,05$ ; Tabela 15).

**Figura 17** - Curvas de sobrevivência das *cohorts* de plantas de azevém suscetível e resistente ao glyphosate. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.



**Tabela 14** - Sobrevivência média das populações de azevém suscetível e resistente ao glyphosate em três *cohorts*. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.

<i>Cohort</i>	População	Sobrevivência	EPM*
1	Suscetível	0,02	0,02
	Resistente	0,04	0,02
2	Suscetível	0,03	0,02
	Resistente	0,05	0,02
3	Suscetível	0,10	0,049
	Resistente	0,16	0,073

\* Erro padrão da média

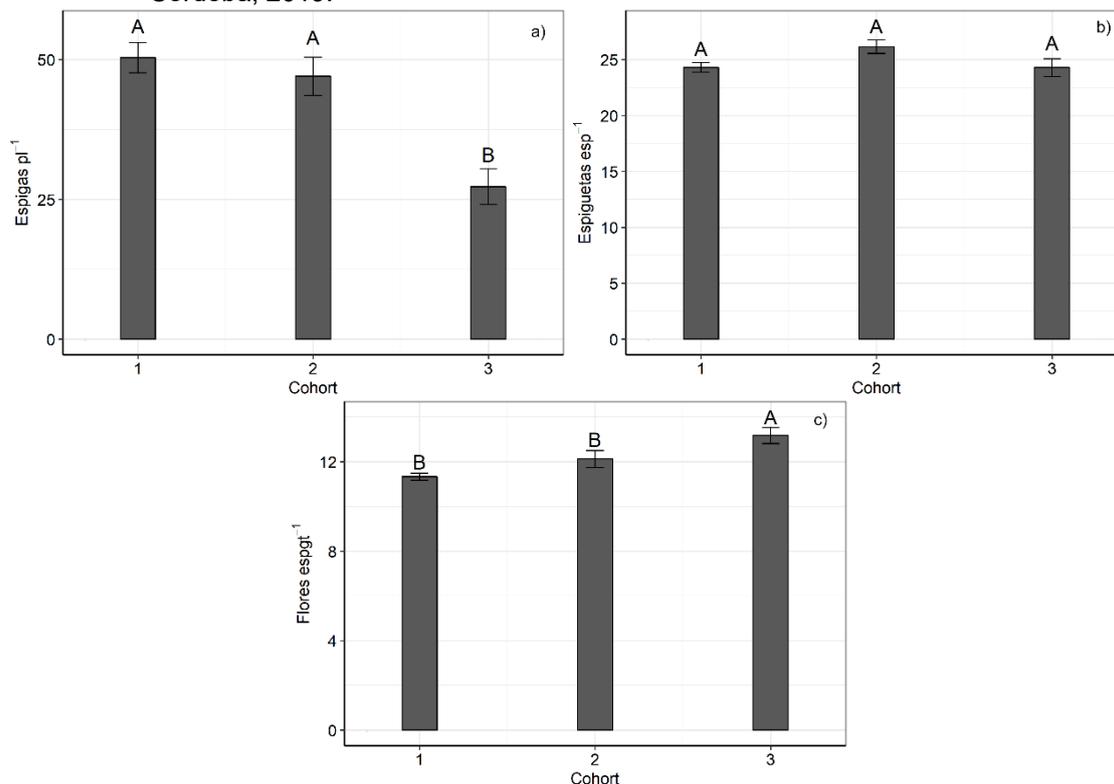
**Tabela 15** - Comparação múltipla de pares sobre o padrão de sobrevivência entre as populações de azevém suscetível e resistente ao glyphosate em três *cohorts*. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.

Comparações	Estatística	Valor de <i>p</i>
C1suscetível vs. C1resistente	0,0011	0,97
C2suscetível vs. C2resistente	4,65	0,2
C3suscetível vs. C3resistente	0,57	0,91
C1suscetível vs. C2suscetível	0,076	0,95
C1suscetível vs. C3suscetível	7,88	0,049*
C2suscetível vs. C3suscetível	7,49	0,048*
C1resistente vs. C2resistente	3,03	0,35
C1resistente vs. C3resistente	9,64	0,024*
C2resistente vs. C3resistente	16,18	0,0008*

#### 4.3.1.3 Caracteres reprodutivos em diferentes *cohorts*

Não foi observada diferença entre as populações suscetível e resistente ao glyphosate quanto aos caracteres reprodutivos avaliados ( $p \leq 0,05$ ) e desta forma os dados foram combinados para o estudo. Em relação ao número de espigas por planta, não houve diferenças significativas entre o primeiro ( $50,34 \pm 2,72$  esp  $pl^{-1}$ ) e o segundo *cohort* ( $47,02 \pm 3,44$  esp  $pl^{-1}$ ), todavia, o terceiro produziu 40% menos espigas ( $27,27 \pm 3,18$  esp  $pl^{-1}$ ) (Figura 18). Para o número de espiguetas por espigas, não houve diferenças significativas entre os três *cohorts* ( $24,29 \pm 0,43$ ;  $26,15 \pm 0,6$  e  $24,29 \pm 0,79$  esp $gt$  esp $^{-1}$ ), respectivamente para os *cohorts* 1, 2 e 3) (Figura 18). Não houve diferença significativa entre os dois primeiros *cohorts* para o número de flores por espiguetas ( $11,33 \pm 0,16$  e  $12,12 \pm 0,38$  flrs esp $gt^{-1}$ , *cohort* 1 e 2 respectivamente), todavia o terceiro foi significativamente superior ( $13,17 \pm 0,36$  flrs esp $gt^{-1}$ ) aos dois primeiros (Figura 18).

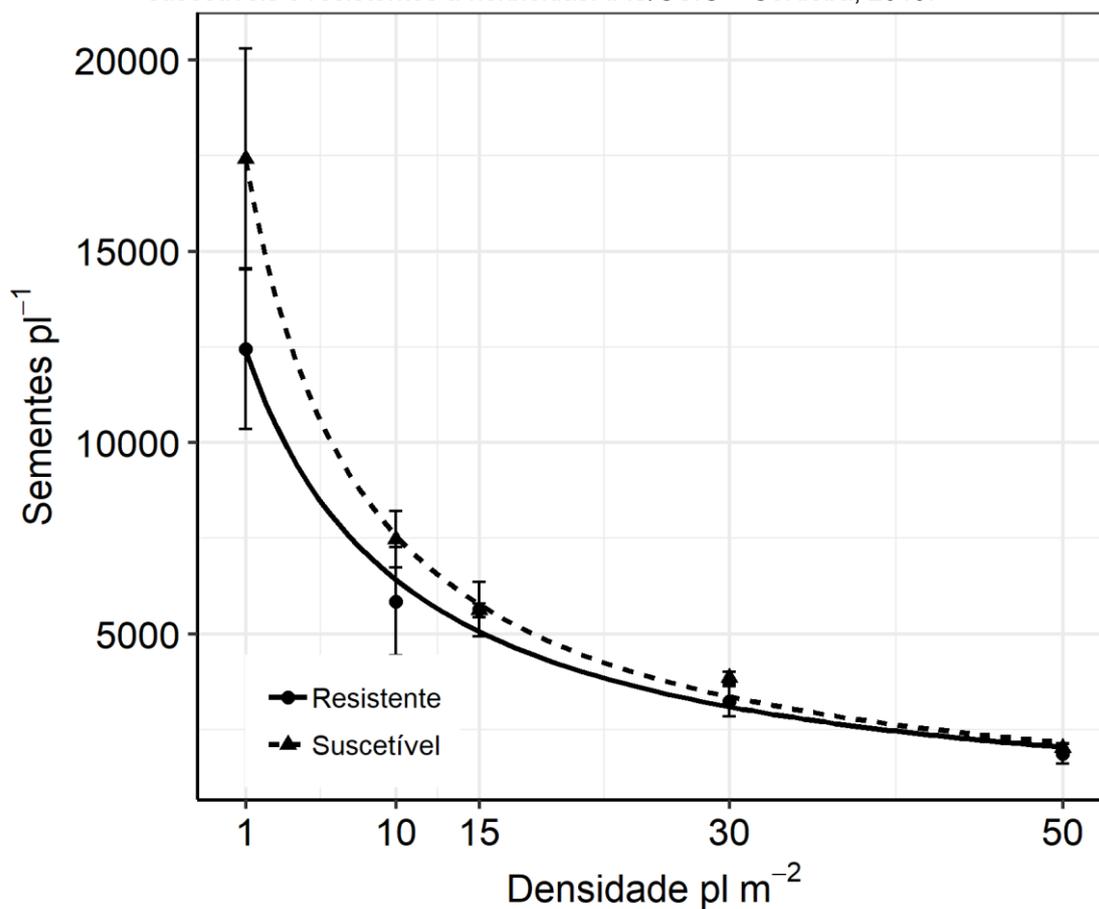
**Figura 18** - Caracteres reprodutivos de azevém, espigas por planta (a), espiguetas por espigas (b) e flores por espiguetas (c) em cada época de estabelecimento. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.



#### 4.3.1.4 Efeito da densidade sobre o potencial de produção de sementes

Em ambas as populações, o modelo de hipérbole retangular apresentou um bom ajuste com os dados observados (Figura 19, Tabela 16), demonstrando que a produção de sementes é dependente da densidade de plantas. Em ambas as populações, os modelos demonstraram que houve redução da fecundidade conforme houve o aumento da densidade, alcançando 90% de redução para a densidade é de 50  $pl\ m^{-2}$ . O máximo potencial de produção de sementes por planta em baixa densidade diferiu significativamente entre as populações suscetível e resistente ( $p \leq 0.05$ ), sendo superior na população suscetível ( $20300 \pm 1212\ s\ pl^{-1}$ ) se comparada com a resistente ( $13830 \pm 1305\ s\ pl^{-1}$ ) (Tabela 16).

**Figura 19** - Efeito da densidade sobre a produção de sementes de biotipos de *L. multiflorum* suscetíveis e resistentes a herbicidas. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.



**Tabela 16** - Parâmetros do modelo de hipérbole retangular (eqn 1). Máxima capacidade de produção de sementes por planta de azevém ( $f$ ) e área requerida para produzir sementes ( $a$ ), raiz do quadrado médio do erro (RQME) e o pseudo coeficiente de determinação ( $R^2$ ), para as populações suscetível e resistente ao glyphosate. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.

População	Parâmetros		RQME	$R^2$
	$f^*$	$a$		
Suscetível	20300,0 (1212,0#)	0,17 (0,03)	110,5	0,97
Resistente	13830,0 (1305,0)	0,12 (0,03)	136,0	0,89

#Valores entre parênteses indicam o erro padrão da média.

\* Os valores de  $f$  se diferem pelo teste  $t$  ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.3.2 Discussão

O estudo da demografia de plantas daninhas é um importante passo na busca do melhor entendimento do comportamento das plantas a nível populacional e para desenvolver estratégias de manejo integradas mais eficientes. Neste trabalho, foram estudados parâmetros demográficos das principais etapas de desenvolvimento de azevém, tanto para a população suscetível quanto resistente ao glyphosate.

O recrutamento médio de plântulas foi de 73%, sendo superior ao observado em condição natural, a qual foi de 40% (ICHIHARA *et al.*, 2010 e MAIA *et al.*, 2009). Sob condições ambientais adequadas, observa-se que o fluxo de emergência de azevém pode ser rápido, e a maior proporção das sementes aptas germinarão em um período de 30 dias. Neste trabalho, as sementes foram posicionadas a 1 cm de profundidade no solo, característica a qual pode ter favorecido a emergência principalmente por serem fotoblásticas positivas (DEREGIBUS *et al.*, 1994). Entretanto, em plantas de azevém tem sido observado que o potencial de emergência é o mesmo em sementes posicionadas dentro dos primeiros 5 cm de solo, mas é reduzida em profundidades maiores (ARNOTT, 1969; VILA-AIUB *et al.*, 2005). Destaca-se que em sistemas conservacionistas, nesta profundidade (0-5 cm) é encontrada a maior proporção (>90%) de sementes de azevém (ICHIHARA *et al.*, 2010). Em conjunto, estes resultados sugerem a alta e rápida emergência das plântulas de azevém em condições ambientais adequadas.

O início da emergência ocorreu aos 16 dias após a semeadura, sendo desencadeada quando a precipitação acumulada atingiu 30 mm. Para *Lolium rigidum*, sugere-se que seja necessária uma precipitação de ao menos 10 mm para iniciar o processo germinativo (FERNANDEZ-QUINTANILLA *et al.*, 2000). Tal fato se assemelha com o observado no presente trabalho.

Os resultados demonstram que a taxa de emergência não diferiu entre as populações suscetível e resistente ao glyphosate. Entretanto, diversos estudos têm caracterizado o fluxo de emergência diferencial entre populações suscetível e resistente ao glyphosate em diferentes espécies de plantas

daninhas, incluindo azevém (GIACOMINI, WESTRA, WARD, 2014; ETEN *et al.*, 2016, FERNÁNDEZ-MORENO *et al.*, 2017). Nestes casos, comumente é atribuído a emergência inferior de populações resistentes em comparação as suscetíveis. Todavia, tem-se observado que o mecanismo responsável pela resistência das plantas ao herbicida pode influenciar diretamente dinâmica de emergência das plântulas (VILA-AIUB *et al.*, 2005; DÉLYE *et al.*, 2013).

A taxa sobrevivência de plântulas, ou seja, a proporção de plântulas que chegam ao estágio adulto foi similar entre o primeiro e o segundo *cohort* para suscetíveis e resistentes, porém inferior às plantas que se estabeleceram no terceiro *cohort*. De fato, a taxa de sobrevivência diferencial limitou-se apenas entre os *cohorts* e não ocorreu entre as populações suscetível e resistente dentro do mesmo *cohort* (Tabela 3). Diversos estudos com diferentes espécies têm demonstrado a sobrevivência diferencial de plantas em função dos diferentes *cohorts*. Em plantas de *C. bonariensis*, a sobrevivência pode variar de 0,13 a 0,44; com *Salsoa australis* pode variar de 0 a 0,75; em *Digitaria sanguinalis* entre 0,003 e 0,2 e com *Amaranthus palmeri* de 0,5 a 0,95 (ZAMBRANO-NAVEA *et al.*, 2018; BORGER *et al.*, 2009; OREJA *et al.*, 2012 e NEVE *et al.*, 2011). A diferença de sobrevivência entre as *cohorts* pode ser explicada pelas diferentes épocas de estabelecimento. Em geral, as plantas que se estabelecem primeiro no ambiente exercem forte competição (intra-específica) sobre as que se estabelecem posteriormente (RADOSEVICH *et al.*, 2007; BORGER *et al.*, 2009). Neste trabalho, a taxa média de sobrevivência, foi semelhante entre o primeiro e o segundo *cohort*, que foram inferiores ao terceiro. Nos primeiros 60 dias após o estabelecimento de cada *cohort*, a precipitação acumulada foi de 127, 174 e 126 mm, enquanto a soma térmica acumulada foi de 891, 690 e 643 °C, respectivamente para as *cohorts* 1, 2 e 3. É possível que a maior sobrevivência do terceiro *cohort* seja atribuída principalmente a distribuição pluviométrica (Figura 3).

As plantas desenvolvidas nos diferentes *cohorts* se diferenciaram em alguns caracteres reprodutivos, tais como espigas por planta e flores por espigeta. O número de espigas por planta foi 40% inferior no terceiro *cohort* em comparação aos dois primeiros, todavia o número de flores por espigeta do

terceiro *cohort* foi em média 13% superior ao primeiro e segundo. O número de espigas por planta variou de 30 a 50, sendo inferior ao observado por Bararpour *et al.* (2017), o qual foi de 100 a 153 espigas por planta em diferentes populações de azevém. O número de espiguetas por espiga foi semelhante ao observado em populações de azevém do Arkansas (23 espiguetas por espiga) (BARARPOUR *et al.*, 2017). O número de flores observado em cada espiguetas situou-se entre 11 e 13, todavia, a fecundação é dependente das condições do ambiente e da proximidade com outras plantas, pois para *Lolium (multiflorum, perenne e rigidum)* é obrigatória a polinização cruzada entre plantas. Em plantas de *L. perenne*, a capacidade natural de polinização pode variar entre 3 e 33% (GREGOR, 1928). Desta forma, condições que afetem o fluxo de pólen, tais como a existência de barreiras físicas (culturas) podem afetar negativamente a polinização. Dentre as plantas do gênero *Lolium*, *L. perenne* é a mais semelhante morfológicamente com o *L. multiflorum*, todavia, o desenvolvimento de *L. perenne* é levemente inferior (TERRELL, 1968).

A capacidade de produção de sementes é um processo dependente da densidade, assim como também é observado com outras plantas daninhas, tais como *L. rigidum*, *D. sanguinalis* e *C. bonariensis* (GONZÁLEZ-ANDÚJAR e FERNÁNDEZ-QUINTANILLA, 2004; OREJA *et al.*, 2012; ZAMBRANO-NAVEA *et al.*, 2018). Neste trabalho, foi observado que a espécie apresenta elevada capacidade reguladora da população, pois 50 pl m<sup>-2</sup> podem reduzir o potencial máximo de produção de sementes em 90% para ambas as populações. Resultados semelhantes foram observados com *L. rigidum* (GONZALEZ-ANDUJAR *et al.*, 2004). O forte efeito regulatório, dependente da densidade, também foi observado em outras espécies, com *C. bonariensis*, a redução do potencial de fecundação pode chegar a 65% em uma densidade similar ao do presente estudo (ZAMBRANO-NAVEA *et al.*, 2018). É importante ressaltar que a diferença existente entre as populações em relação a fecundidade máxima ocorre apenas em baixa densidade (Tabela 16). Diferença no potencial de produção de sementes em populações suscetíveis e resistentes ao glyphosate também tem sido descrita com o gênero *Lolium*. Plantas de azevém suscetíveis ao glyphosate produziram 8000 s pl<sup>-1</sup>, enquanto que plantas

resistentes produziram 5000 s pl<sup>-1</sup>, em condição de casa de vegetação (FERNÁNDEZ-MORENO *et al.*, 2017). Resultados semelhantes são observados com plantas de *L. perenne*, aonde que plantas suscetíveis ao glyphosate produziram 7500 s pl<sup>-1</sup> e plantas resistentes 5000 s pl<sup>-1</sup> (YANNICCARI *et al.*, 2016).

Diferentemente do observado no presente estudo, trabalhos efetuados por Vargas *et al.* (2005) e Yanniccari *et al.* (2016), respectivamente, com *L. multiflorum* e *L. perene*, constataram diferenças de caracteres reprodutivos entre populações suscetíveis e resistentes ao glyphosate. Diversos fatores biológicos e moleculares podem estar envolvidos no custo adaptativo em plantas resistentes ao glyphosate, todavia, acredita-se que o principal seja relacionado a redução da eficiência catalítica da EPSPs, devido as mutações que proporcionam alterações na estrutura da enzima (VILA-AIUB *et al.*, 2019). Destaca-se a importância desta enzima, pois aproximadamente 30% de todo o carbono fixado pela planta passa pela rota do ácido chiquímico, a qual é constituinte (MAEDA, DUDAREVA, 2012). Todavia, em plantas cujo o mecanismo de resistência é a superexpressão da EPSPs, tem sido observado maior produção de compostos relacionados ao metabolismo secundário e produção de sementes, se comparadas a isolinhas em que não há a superexpressão da enzima (BERES *et al.*, 2018; FANG *et al.*, 2018). Por isto, foi sugerido que as plantas poderiam apresentar vantagem em ambientes sem a aplicação do glyphosate (VILA-AIUB *et al.*, 2019). Portanto, para o melhor entendimento do custo adaptativo em plantas resistentes a herbicidas, é importante o estudo do mecanismo envolvido na resistência.

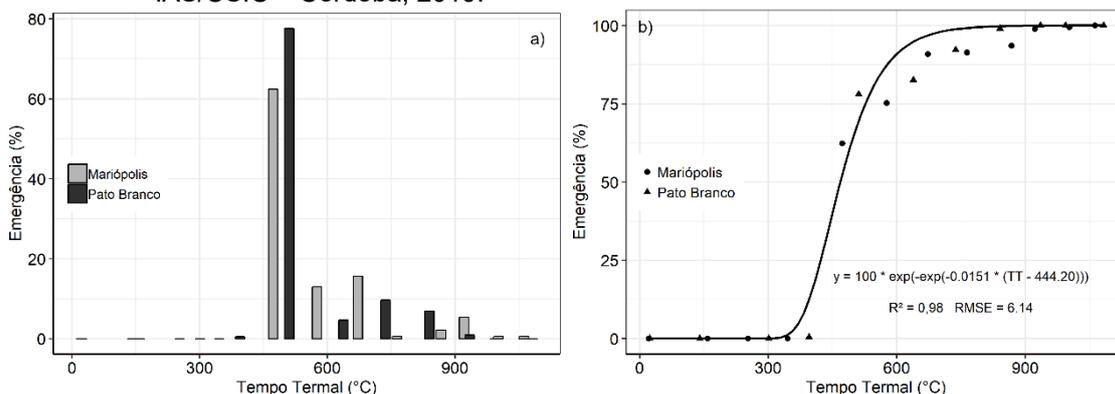
O manejo de plantas daninhas deve ser efetuado não apenas com o uso de herbicidas, mas sim com a combinação de sistemas de cultivos. A diversificação de sistemas é apresentada como a estratégia de manejo mais eficiente para o manejo de plantas daninhas (ZAMBRANO-NAVEA *et al.*, 2016). Desta forma, problemas mais complexos, tais como a resistência de plantas daninhas a herbicidas, poderia ser prevenida com a adoção de estratégias de manejo integrado, para as quais o conhecimento demográfico das populações poderia fornecer uma contribuição muito significativa.

## 4.4 PREVISÃO DA EMERGÊNCIA DE AZEVÉM UTILIZANDO O TEMPO TERMAL DO SOLO

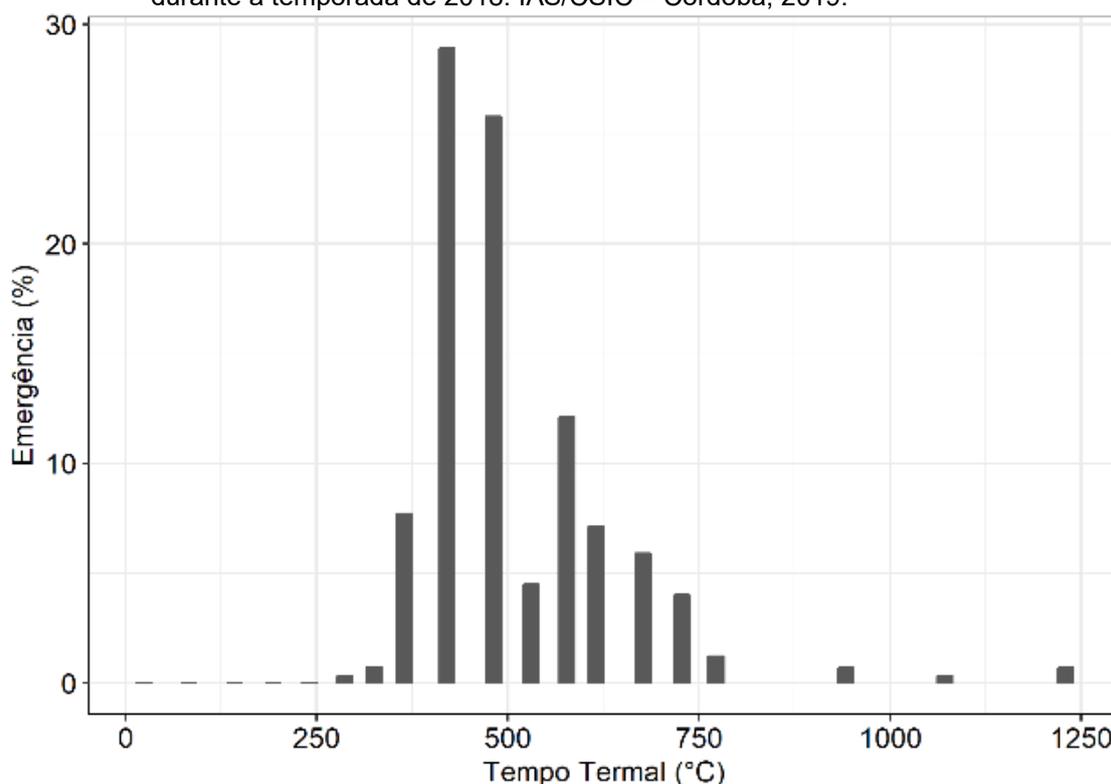
### 4.4.1 Resultados

O número médio de plântulas emergidas durante a temporada de 2016 foi de 149 pl m<sup>2</sup> em Mariópolis e 174 pl m<sup>2</sup> em Pato Branco. Não foi observada diferença entre os locais de amostragem (Mariópolis e Pato Branco) para o padrão de emergência de plântulas ( $p \leq 0,05$ ), desta forma os dados foram combinados para o ajuste do modelo de regressão (Figura 20A). Em ambos os locais, a emergência iniciou com aproximadamente 400 TT, se estendendo até aproximadamente 950 TT. O pico de emergência foi observado logo após o seu início, se situando entre 450 e 500 TT. Na temporada de 2018, o número médio de plântulas emergidas foi de 38 plântulas m<sup>-2</sup> e a emergência iniciou com aproximadamente 300 TT, se estendendo até 1250 TT (Figura 21).

**Figura 20** - Emergência para cada tempo termal (A) e acumulada (B) de azevém observada para os municípios de Mariópolis e Pato Branco, dados coletados durante o ano de 2016. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.



**Figura 21** - Emergência de azevém observada no município de Pato Branco. Dados coletados durante a temporada de 2018. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.



A função de Gompertz apresentou melhor ajuste aos dados observados em comparação as funções, Logística e Weibull ( $AICc = 88.66, 97.18$  e  $146.93$  respectivamente) (Tabela 17). Desta forma, foi escolhida para descrever a emergência de azevém.

**Tabela 17** - Critério de informação de Akaike corrigido ( $AICc$ ) para os modelos de Gompertz, Logistic e Weibull. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.

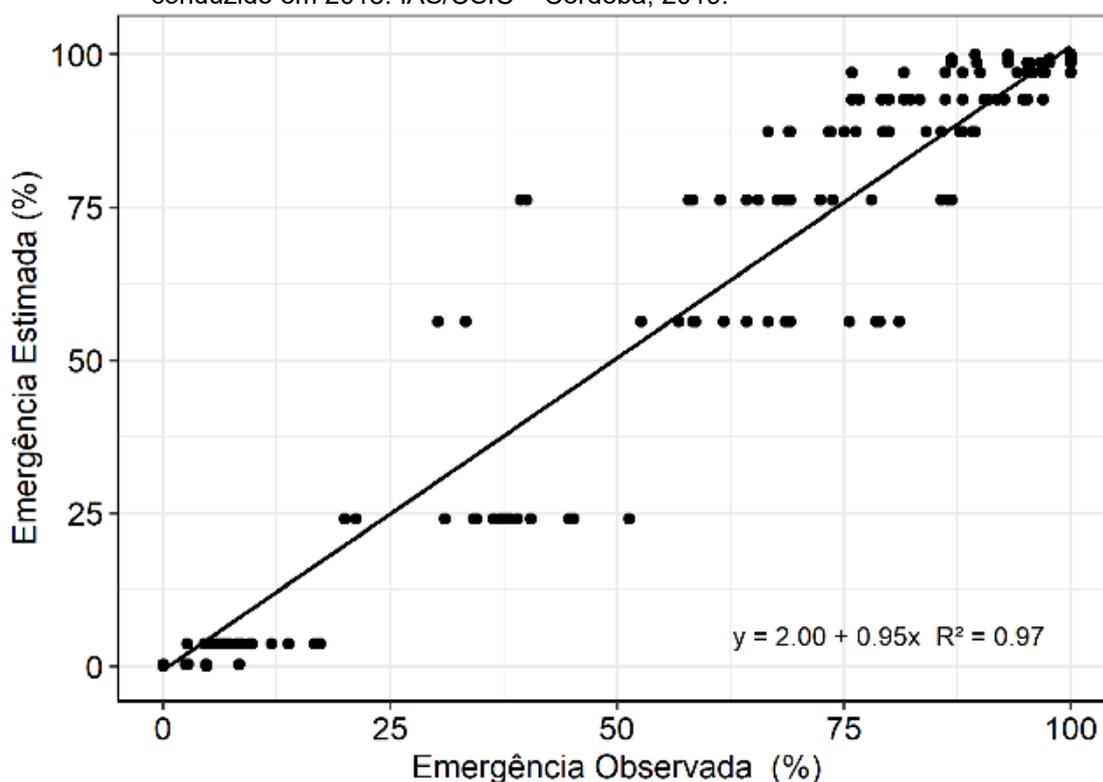
Modelo	$AICc$
Gompertz	88.16*
Logistic	97.18
Weibull	146.94

\*O menor valor é melhor

O modelo de Gompertz com o tempo termal apresentou um bom ajuste com os dados observados ( $R^2 = 0,98$  e  $RMSE = 6,14$ ), e indicou precisão para explicar a emergência acumulativa da espécie (Tabela 18). De acordo com o modelo, a emergência pode iniciar em aproximadamente 300 TT, alcançando 50% com 444 TT e 90% com 590 TT (Figura 20B).

O modelo foi validado com um conjunto de dados independente coletados na temporada de 2018. A relação entre a emergência de plântulas observada e a prevista pelo modelo de Gompertz mostrou boa correspondência ( $R^2 = 0,97$ ) (Figura 22). Os valores de ME e CE foram 0,97 e 0,08 respectivamente, corroborando com a indicação de que os dados estimados são muito semelhantes aos dados observados (Tabela 19). O valor do CD (1,07) indica que o modelo pode superestimar ligeiramente a emergência de plântulas. De fato, os valores observados em cada método foram próximos do esperado, confirmando que o modelo é eficiente para descrever a emergência de azevém.

**Figura 22** - Validação do fluxo de emergência de azevém. Dados coletados do experimento conduzido em 2018. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.



**Tabela 18** - Valores dos parâmetros e performance do modelo de Gompertz (Erro padrão entre parênteses). IAS/CSIC – Córdoba, 2019.

Parâmetros			RQME	R <sup>2</sup>
<i>k</i>	<i>B</i>	<i>m</i>		
100.00	0.0151 (0.002)*	444.20 (8.65)*	6.14	0.98

\* Significativo a  $P < 0.05$ ; RQME: Raiz do quadrado médio do erro.

**Tabela 19** - Performance estatística para o modelo Gompertz. R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinação; ME: Eficiência do modelo; CE: Coeficiente de erro; CD: Coeficiente de determinação do modelo. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.

R <sup>2</sup>	EM	CE	CD
0,97	0,97	0,08	1,07

#### 4.4.1 Discussão

Diferentes estudos tem sido desenvolvidos para modelar a emergência de *L. rigidum* no Clima Mediterrâneo (HADI *et al.*, 2009; IZQUIERDO *et al.*, 2013), mas ainda não existe um modelo para descrever a emergência de azevém sob condições de clima Subtropical Úmido e Temperado, como é o caso da Região Sul do Brasil. O modelo de Gompertz apresentou o melhor ajuste aos dados observados, resultados semelhantes também foram relatados por Izquierdo *et al.* (2013) com *L. rigidum*. O modelo foi validado com dados obtidos em um experimento independente e demonstrou precisão ao prever a emergência de azevém. De fato, isto foi confirmado através da verificação da qualidade do ajuste com diferentes estatísticas métricas, em que os valores observados em cada metodologia foram próximos ao esperado quando se buscava um ajuste perfeito. Isto confirma que o modelo apresentado é eficiente na descrição da emergência de plântulas de azevém.

O modelo previu que a emergência atingiria 90% quando a soma térmica do solo atingisse 590 TT, valor este superior ao observado para *L. rigidum*, que se situa entre entre 242 e 390 TT (FERNANDEZ-QUINTANILLA *et al.*, 2000; HADI e GONZÁLEZ-ANDÚJAR, 2009; IZQUIERDO *et al.*, 2013). De fato, a variabilidade entre espécies e ambientes é esperada em estudos de emergência de plântulas em espécies daninhas, devido ao requerimento térmico diferencial entre as espécies e os diferentes sistemas de manejo em cada área de cultivo. Ao avaliar a emergência de 10 espécies de plantas daninhas em diferentes ambientes, Dorado *et al.* (2009) observaram que a exigência térmica para obter 90% das plantas emergidas pode variar de 208 a 2744 TT.

O desenvolvimento de modelos preditivos para descrever a emergência de plântulas, tem como objetivo principal a aplicação de estratégias de manejo mais eficientes para o controle de plantas daninhas. A destes

resultados, considera-se que uma única aplicação de herbicida pós-emergência em um determinado momento poderia controlar a grande parte das plantas presentes na área. De fato, o modelo também fornece suporte para o uso de herbicidas pré-emergentes, pois é possível aplicar o herbicida abrangendo o maior número de plântulas com probabilidade de emergência. No Brasil, as populações de azevém têm sido caracterizadas como sendo resistentes aos herbicidas inibidores da EPSPs, ALS e ACCase (HEAP, 2020). Felizmente, ainda não há casos registrados de plantas de azevém resistentes a herbicidas pré-emergentes recomendados para o manejo da espécie (ex: trifluralin e S-metholaclor). A aplicação de estratégias de manejo mais eficientes poderia retardar a evolução de populações resistentes.

Estudos que avaliam a emergência de azevém demonstram que o processo ocorre principalmente na primeira metade do outono (MAIA *et al.*, 2008). Acredita-se que a emergência se concentre nesse período devido ao término da dormência primária das sementes no período pós-maturação, quando as sementes são expostas a altas temperaturas durante o verão (STEADMAN *et al.*, 2003; ICHIHARA *et al.*, 2009). Os resultados observados com os experimentos realizados em 2016 estão de acordo com esta afirmação. Nos ensaios de 2016, observou-se que a distribuição das chuvas foi semelhante nos dois locais, mostrando que o solo apresentava condições favoráveis de umidade para o início do processo de germinação. Neste caso, assume-se que o fator limitante para desencadear o processo germinativo é o acúmulo térmico do solo. Como demonstrado por Bradford (2002), a temperatura é considerada o principal fator regulador da dormência e germinação das sementes em ambientes de clima temperado.

Modelos baseados apenas no acúmulo térmico do solo podem, ser eficazes para descrever a emergência de plântulas de diferentes espécies (Dorado *et al.*, 2009; Yousefi *et al.*, 2014). No entanto, alguns aspectos devem ser considerados quando se trabalha com modelos empíricos para descrever a emergência. O início da contabilização do acúmulo térmico deve partir de um período específico, e neste trabalho, a contabilização em 2016 foi iniciada a partir da colheita da cultura da soja, predecessora do azevém. Pesquisadores têm

sugerido que a contabilização deve iniciar com o plantio de uma nova safra (FORCELLA *et al.*, 2000), o que proporciona uma comparação direta do tempo de aparecimento entre a planta daninha e a cultura. Condições climáticas atípicas também podem impactar nos resultados gerados pelo modelo. Estudos desenvolvidos com *Abutilon theophrasti* indicaram que as necessidades térmicas das sementes da América do Norte e do Mediterrâneo (Espanha e Portugal) são distintas (MYERS *et al.*, 2004; DORADO *et al.*, 2009). Isto pode ser afetado pelas condições ambientais sob as quais os experimentos foram conduzidos, ou pelo manejo do solo e pelas características genéticas das sementes. No presente trabalho, ambos os locais experimentais em 2016 pertencem à mesma região climática, o que pode ter contribuído para a precisão do modelo. Portanto, para uma melhor compreensão da emergência de plântulas de azevém, mais trabalhos devem ser realizados com dados coletados em diferentes ambientes, para que seja possível reconhecer padrões mais facilmente e assim desenvolver modelos amplos.

O modelo Gompertz foi apropriado para descrever a emergência de plântulas de azevém em função do tempo térmico do solo. Os testes de validação demonstraram uma boa correspondência entre os dados observados e previstos. Modelos de previsão empírica de emergência podem ser incorporados aos sistemas de suporte de decisão como uma ferramenta para o manejo integrado de plantas daninhas (GONZALEZ-ANDUJAR *et al.*, 2010). Isto pode contribuir para um manejo mais eficiente e sustentável das plantas daninhas, bem como para a redução da dispersão da resistência aos herbicidas.

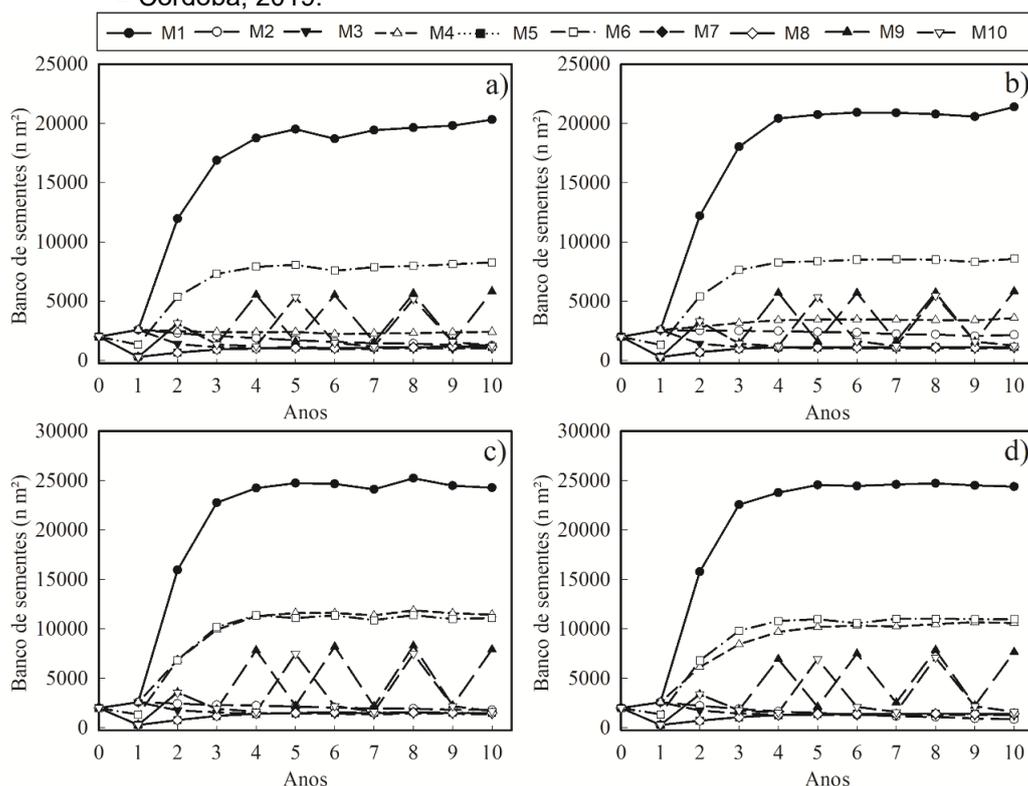
## 4.5 MODELANDO A DINÂMICA POPULACIONAL E ESTRATÉGIAS DE MANEJO DE AZEVÉM SOB DOIS CENÁRIOS CLIMÁTICOS

### 4.5.1 Resultados

#### 4.5.1.1 Cenário 1 (*Temperatura média 2007 – 2017*)

A estratégia M1 indica o desenvolvimento dos três *cohorts* sem interferência e representa o máximo número de sementes no banco (Figura 23). Este manejo pode ser utilizado como uma linha base em comparação as demais estratégias de manejo. Ambas as populações suscetível e resistente apresentaram valores próximos. Com a população suscetível, o banco de sementes tende a estabilizar em  $19121 \pm 371$  s  $m^{-2}$ , enquanto que a população resistente se estabiliza com  $20463 \pm 363$  s  $m^{-2}$ . Ambas as populações se estabilizaram a partir do terceiro ano de simulação.

**Figura 23** - Evolução do banco de sementes de populações de azevém, para o Cenário 1 considerando a temperatura média para o período de 2007 - 2017, para suscetível (a) e resistente (b) ao glyphosate, e para o cenário 2 com previsão de incremento médio na temperatura diária de 2,5 °C para suscetível (a) e resistente (b) ao glyphosate. Sob diferentes estratégias de manejo. **M1** = Pousio, **M2** = PosTC1 + PosPC2, **M3** = PosTC1 + PosTC2 + PosPC3, **M4** = PosPC2 + PosTC3, **M5** = T/S, **M6** = A/S, **M7** = A/M, **M8** = T/S/A/M, **M9** = A/S/A/M, **M10** = T/S/A/M/A/S. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.



Apesar das populações suscetível e resistente se diferirem quanto ao potencial de produção de sementes, as estratégias de manejo afetaram o banco de sementes de ambas as populações de forma semelhante (Figura 23a

e 23b). Os manejos químicos utilizados (M2, M3 e M4) apresentaram elevado impacto sobre o banco de sementes e foram capazes de reduzi-lo em mais de 15% ( $1578 \pm 99$ ,  $1008 \pm 15$  e  $2338 \pm 25$  para o suscetível e  $2296 \pm 57$ ,  $1044 \pm 18$  e  $3409 \pm 42$  s m<sup>-2</sup> para o resistente respectivamente para cada estratégia de manejo M2, M3 e M4) em relação a linha base (M1). A estratégia M3 que é composta pela abrangência de aplicação nos três *cohorts* (PosTC1 + PosTC2 + PosPC3) apresentou o maior potencial de supressão do banco de sementes, chegando a 95% em relação a linha base em ambas as populações.

A estratégias de manejo M5 e M7 tem como base os cultivos de trigo/soja e aveia/milho respectivamente. Ambos reduziram o banco de sementes de forma similar, chegando a 95% de redução ( $1060 \pm 27$  e  $1068 \pm 26$  s m<sup>-2</sup> para o suscetível e  $1090 \pm 57$  e  $1092 \pm 17$  s m<sup>-2</sup> para o resistente respectivamente para M5 e M7) em relação ao M1. A estratégia M6, que corresponde ao cultivo de aveia/soja apresentou menor potencial de redução do banco de sementes em comparação as demais estratégias de manejo, chegando a 60% de redução ( $7877 \pm 111$  e  $8339 \pm 108$  s m<sup>-2</sup> suscetível e resistente respectivamente) quando comparado a M1.

A estratégia M8 corresponde a uma alternância entre M5 e M7 e também indicou redução de 95% ( $1059 \pm 31$  e  $1091 \pm 15$  s m<sup>-2</sup> suscetível e resistente respectivamente) em relação a M1. As estratégias M9 e M10 utilizam sistemas de sucessão de cultivos com diferentes potenciais de supressão do banco de sementes, os quais correspondem a combinações em alternância dos manejos M5, M6 e M7. Nesses manejos, houve sazonalidade do sistema, de forma que a supressão variou de 70 a 95% de acordo com o ano de cultivo em ambas as populações ( $5623 \pm 67$  e  $1203 \pm 27$  s m<sup>-2</sup> e  $5741 \pm 31$  e  $1226 \pm 14$  s m<sup>-2</sup> respectivamente para as populações suscetível e resistente).

#### 4.5.1.2 Cenário 2 (Incremento de 2.5°C na temperatura média)

Com a elevação esperada da temperatura como consequência das mudanças climáticas, aumento na capacidade de suporte do ambiente é observado em relação ao Cenário 1 (Figura 23). O aumento foi de 26% para a

população suscetível ( $19121 \pm 371 \Rightarrow 24182 \pm 253$  sementes  $m^{-2}$ ) e 18% para a população resistente ( $20463 \pm 363 \Rightarrow 24299 \pm 255$  sementes  $m^{-2}$ ). Da mesma forma, os resultados demonstram que o efeito do aumento da temperatura implica em aumento da população em todas as estratégias de manejo em relação ao Cenário 1 (Figura 1). De modo geral, a eficiência de redução de cada estratégia de manejo em relação à linha base foi semelhante ao observado no Cenário 1. A exceção foi da estratégia M4, na qual o modelo indica redução da eficiência em comparação ao Cenário 1. Com a população suscetível, o banco de sementes da estratégia M4 foi reduzida em 60% ( $10067 \pm 258$  s  $m^2$ ), enquanto que para a resistente a redução foi de 55% ( $11319 \pm 212$  s  $m^2$ ), em comparação a linha base (M1) de cada população. Isto corresponde a uma perda de eficiência da estratégia em cerca de 30% no Cenário 2 em relação ao Cenário 1.

A eficiência da redução do banco de sementes das demais estratégias de manejo baseadas nos métodos químicos foi superior a 95% tanto para a população suscetível (M2;  $1293 \pm 128$  e M3;  $1303 \pm 18$  sementes  $m^{-2}$ ) quanto a resistente (M2;  $2023 \pm 37$  e M3;  $1425 \pm 18$  sementes  $m^{-2}$ ). Com as estratégias baseadas nos sistemas de rotação de cultura, a redução do banco de sementes variou entre 55% (M6;  $10763 \pm 149$  sementes  $m^{-2}$ ) e 94% (M7;  $1335 \pm 41$  sementes  $m^{-2}$ ) para populações suscetíveis e entre 54% (M6;  $11036 \pm 140$  sementes  $m^{-2}$ ) e 94% (M8;  $1462 \pm 40$  sementes  $m^{-2}$ ) para as resistentes em relação a linha base.

#### 4.5.2 Discussão

As simulações foram realizadas utilizando as principais estratégias de manejo implantadas pelos agricultores da Região Sul do Brasil e envolveram tanto cultivos de inverno como cultivos de verão. A natureza estocástica do modelo permite avaliar o efeito da variabilidade dos parâmetros demográficos (ZAMBRANO-NAVEA *et al.*, 2016). Isto pode ser descrito como o efeito de fatores bióticos e abióticos no sistema e é uma ferramenta importante para demonstrar as possíveis flutuações nos resultados gerados pelo modelo. O banco de sementes observado no Cenário 1 com a linha base, situou-se entre

19121±371 s m<sup>-2</sup> (suscetível) e 20463±363 s m<sup>-2</sup> (resistente). Estes resultados estão de acordo com o observado em condições naturais do banco de sementes da espécie em áreas de lavoura (MAIA *et al.* 2008). Estes níveis populacionais são altos o suficiente para proporcionar perdas elevadas no rendimento de grãos de culturas se a planta daninha não for controlada (NANDULA *et al.*, 2014).

Estratégias que são baseadas exclusivamente no manejo químico M2 e M3, apresentaram elevada eficiência e foram capazes de suprimir o banco de sementes em mais de 95% em relação à linha base de cada população em ambos os cenários climáticos. Todavia, o potencial de supressão do banco de sementes pelo manejo M4 passou de 85% (ambas as populações suscetível e resistente) no Cenário 1 para 55 (resistente) e 60% (suscetível) no Cenário 2. A elevação prevista da temperatura implica diretamente na velocidade de acúmulo térmico do solo, refletindo na antecipação da emergência de plântulas. O incremento da temperatura do solo promove a sincronização e reduz a distribuição temporal da emergência de plântulas (VARANASI *et al.*, 2016). Conforme observado, isto pode trazer implicações quanto ao manejo da espécie, principalmente para o manejo M4, pois o aumento de temperatura previsto no Cenário 2 resulta em menor eficiência, tanto para a população suscetível como resistente a herbicidas, em comparação a linha base. No cenário 2, o aumento da temperatura resulta no aumento da velocidade da emergência de plântulas de azevém promovendo o aumento do número de indivíduos no primeiro *cohort* em detrimento ao segundo e terceiro. A antecipação da emergência é um indicativo de que estratégias de manejo deverão ser adotadas antecipadamente, principalmente considerando o cultivo de trigo, pois plantas já estabelecidas no ambiente possuem maior potencial de reduzir o potencial produtivo de culturas se comparado as plântulas que se emergem após o estabelecimento da cultura (RADOSEVICH *et al.*, 2007).

As estratégias de manejo que utilizam trigo e milho demonstraram elevada eficiência na redução do banco de sementes de azevém. De fato, o manejo de plantas de azevém para o plantio do trigo ocorre antes que estas iniciem o estágio reprodutivo, enquanto que as que emergem após o plantio comumente são controladas por herbicidas pós emergentes. Considerando a

introdução de milho no sistema, o manejo das plantas de azevém, comumente ocorre anterior a etapa de maturação fisiológica das sementes. Em ambos os casos, ocorre a redução da quantidade de sementes que retornam ao banco.

As estratégias de cultivo que incluem aveia seguido por soja, indicaram menor potencial em suprimir o banco de sementes de azevém. O fato pode ser atribuído principalmente a ausência de aplicação de herbicidas em pós emergência da aveia para o manejo de azevém (Galvan *et al.*, 2015), desta forma, as plantas de azevém que emergirem após as plantas aveia são afetadas principalmente pela competição interespecífica.

As estratégias de manejo M9 e M10 demonstraram que o potencial de supressão do banco de sementes é dependente do ano de cultivo. Nestes manejos, é observado que durante os anos em que há o cultivo de aveia/soja, o número de sementes de azevém presentes no banco é inferior ao manejo contínuo somente com aveia/soja (M7). Isto é um indicativo de que a diversificação do sistema de cultivo também contribui com a redução do banco de sementes de plantas daninhas e a longo prazo, proporciona resultados mais satisfatórios se comparados a um sistema contínuo (ZAMBRANO-NAVEA *et al.*, 2016). A diversificação de sistemas é sugerida como uma ferramenta mais adequada na busca de melhores estratégias de manejo de plantas daninhas. De fato, além de melhorar o controle de plantas daninhas, considerando um sistema, a rotação de plantas de cobertura é fundamental para auxiliar no controle de pragas e doenças, tal como o mal do pé do trigo, além de contribuir com a melhoria da qualidade química dos solos (PRIMAVESI *et al.*, 2000). Especula-se que, em virtude das mudanças climáticas, medidas de manejo baseadas no controle químico possam se tornar menos eficazes devido a uma mudança no ambiente (condições mais secas e quentes) ou alterações na anatomia, fisiologia, crescimento e fenologia das plantas daninhas alvo (ZISKA *et al.*, 2015). Este fato realça a importância da diversificação de sistemas de cultivo.

As mudanças climáticas podem ser consideradas como um dos principais problemas a serem enfrentados pelos agricultores futuramente. O uso de modelos pode dar uma visão da dinâmica de populações de plantas daninhas a longo prazo. As abordagens das dinâmicas populacionais podem

desempenhar um papel fundamental ao preencher lacunas no estudo da ecofisiologia e do nicho climático. Os resultados deste trabalho demonstram o aumento em populações resistentes e suscetíveis, sugerindo agravamento da infestação desta espécie. As estratégias aqui simuladas são comumente utilizadas pelos agricultores, mas apesar do alto nível de controle em alguns casos, eles não parecem ser eficientes para alcançar o controle satisfatório da espécie sob o cenário de mudanças climáticas considerado.

De fato, apesar das populações suscetível e resistente diferirem quanto ao número de sementes produzidas por planta em baixas densidades, o banco de sementes em equilíbrio, das populações suscetível e resistente ao glyphosate são similares, mesmo comparando a linha base entre as populações. De fato, com o aumento da densidade de plantas, é observada redução da diferença na capacidade de produção de sementes por planta entre as populações (Item 4.3). Populações de *Bassia scoparia* suscetíveis e resistentes ao glyphosate, apesar de se diferirem em taxas de emergência, não apresentam diferenças quanto ao montante final de sementes presentes no banco (OSIPITAN *et al.*, 2019). Todavia, diferenças entre as populações seriam observadas considerando a aplicação de glyphosate de forma isolada, em que as plantas suscetíveis seriam controladas e as resistentes sobreviveriam.

A análise de sensibilidade (Tabelas 20 e 21) revelou que os parâmetros demográficos mais sensíveis às variações foram fecundação e a capacidade de polinização. Para as populações suscetível e resistente, em ambos os cenários, a análise de sensibilidade demonstrou que, dentre os três *cohorts*, o número final de indivíduos adultos é afetado principalmente pelo primeiro e segundo *cohort*, pelo fato de estes serem representados pelas primeiras plantas que se estabelecem no ambiente e por isso possuem vantagem competitiva em relação as demais, além disso, condições ambientais mais favoráveis ao desenvolvimento das plantas pode ser considerado nesta época. Isto demonstra que as estratégias de manejo devem ser direcionadas as plantas que se estabelecem nestes *cohorts* para que se obtenha maior sucesso de controle tanto de indivíduos suscetíveis como resistentes. Também é possível observar que o tamanho da população é afetado pela capacidade de polinização.

A espécie apresenta alto potencial de produção de sementes, todavia, estudos conduzidos com *Lolium perenne*, indicam que a capacidade polinização natural é de apenas 12% (GREGOR, 1928). Um dos fatores que contribuem é de que a fecundação é dependente da polinização cruzada, a qual pode ser facilmente afetada pelas condições climáticas. Longos períodos de precipitação podem dificultar a dispersão do pólen enquanto que períodos com temperaturas muito elevadas e baixa umidade do ar podem reduzir a sua viabilidade. De fato, a ausência de insetos polinizadores também pode contribuir com a redução da polinização.

**Tabela 20** - Análise de sensibilidade dos parâmetros utilizados no modelo para cada cenário de manejo para as populações suscetível e resistente considerando o Cenário 1. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.

Parâmetros	Manejo*									
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
Suscetível										
<i>sm</i> **	-0.17	-0.83	-0.18	-0.34	-0.02	-0.08	-0.02	-0.02	-0.03	-0.03
<i>e</i>	-0.25	0.80	-0.20	0.27	0.21	0.01	0.21	0.21	0.14	0.15
<i>sdls</i> <sub>11</sub>	0.18	0.07	0.08	0.70	0.09	0.19	0.09	0.09	0.12	0.12
<i>sdls</i> <sub>12</sub>	0.008	0.965	0.201	0.044	0.184	0.023	0.184	0.184	0.110	0.115
<i>sdls</i> <sub>13</sub>	0.038	0.094	0.001	0.008	0.005	0.022	0.005	0.005	0.008	0.008
<i>f</i>	0.60	0.89	0.60	0.80	0.60	0.60	0.60	0.60	0.59	0.59
<i>lp</i>	3.10	2.92	3.75	4.89	3.90	4.42	3.90	3.90	3.88	3.93
<i>sl</i>	-0.28	-0.72	-0.28	-0.57	-0.28	-0.28	-0.28	-0.28	-0.27	-0.27
Resistente										
<i>sm</i>	-0.17	-0.83	-0.18	-0.34	-0.02	-0.08	-0.02	-0.02	-0.03	-0.03
<i>e</i>	-0.25	0.80	-0.20	0.27	0.21	0.01	0.21	0.21	0.14	0.15
<i>sdls</i> <sub>11</sub>	0.18	0.07	0.08	0.70	0.09	0.19	0.09	0.09	0.12	0.12
<i>sdls</i> <sub>12</sub>	0.008	0.965	0.201	0.044	0.184	0.023	0.184	0.184	0.110	0.115
<i>sdls</i> <sub>13</sub>	0.038	0.094	0.001	0.008	0.005	0.022	0.005	0.005	0.008	0.008
<i>f</i>	0.60	0.89	0.60	0.80	0.60	0.60	0.60	0.60	0.59	0.59
<i>lp</i>	3.10	2.92	3.75	4.89	3.90	4.42	3.90	3.90	3.88	3.93
<i>sl</i>	-0.28	-0.72	-0.28	-0.57	-0.28	-0.28	-0.28	-0.28	-0.27	-0.27

\***M1** = Pousio, **M2** = PosTC1 + PosPC2, **M3** = PosTC1 + PosTC2 + PosPC3, **M4** = PosPC2 + PosTC3, **M5** = T/S, **M6** = A/S, **M7** = A/M, **M8** = T/S/A/M, **M9** = A/S/A/M, **M10** = T/S/A/M/A/S.

\*\***sm** = Mortalidade de sementes no banco, **e** = Emergência, **sdls**<sub>11</sub> = Sobrevivência de plântulas, **sdls**<sub>12</sub> = Sobrevivência de plântulas, **sdls**<sub>13</sub> = Sobrevivência de plântulas, **f** = Máxima produção de sementes por planta, **lp** = Perda na polinização, **sl** = Perda de sementes.

**Tabela 21** - Análise de sensibilidade dos parâmetros utilizados no modelo para cada cenário de manejo para as populações suscetível e resistente considerando o Cenário 2. IAS/CSIC – Córdoba, 2019.

Parâmetros	Manejo*									
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
Suscetível										
<i>sm</i> **	-0.17	-0.83	-0.18	-0.34	-0.02	-0.08	-0.02	-0.02	-0.03	-0.03
<i>e</i>	-0.25	0.80	-0.20	0.27	0.21	0.01	0.21	0.21	0.14	0.15
<i>sdlsi1</i>	0.18	0.07	0.08	0.70	0.09	0.19	0.09	0.09	0.12	0.12
<i>sdlsi2</i>	0.008	0.965	0.201	0.044	0.184	0.023	0.184	0.184	0.110	0.115
<i>sdlsi3</i>	0.038	0.094	0.001	0.008	0.005	0.022	0.005	0.005	0.008	0.008
<i>f</i>	0.60	0.89	0.60	0.80	0.60	0.60	0.60	0.60	0.59	0.59
<i>lp</i>	3.10	2.92	3.75	4.89	3.90	4.42	3.90	3.90	3.88	3.93
<i>sl</i>	-0.28	-0.72	-0.28	-0.57	-0.28	-0.28	-0.28	-0.28	-0.27	-0.27
Resistente										
<i>sm</i>	-0.17	-0.83	-0.18	-0.34	-0.02	-0.08	-0.02	-0.02	-0.03	-0.03
<i>e</i>	-0.25	0.80	-0.20	0.27	0.21	0.01	0.21	0.21	0.14	0.15
<i>sdlsi1</i>	0.18	0.07	0.08	0.70	0.09	0.19	0.09	0.09	0.12	0.12
<i>sdlsi2</i>	0.008	0.965	0.201	0.044	0.184	0.023	0.184	0.184	0.110	0.115
<i>sdlsi3</i>	0.038	0.094	0.001	0.008	0.005	0.022	0.005	0.005	0.008	0.008
<i>f</i>	0.60	0.89	0.60	0.80	0.60	0.60	0.60	0.60	0.59	0.59
<i>lp</i>	3.10	2.92	3.75	4.89	3.90	4.42	3.90	3.90	3.88	3.93
<i>sl</i>	-0.28	-0.72	-0.28	-0.57	-0.28	-0.28	-0.28	-0.28	-0.27	-0.27

\***M1** = Pousio, **M2** = PosTC1 + PosPC2, **M3** = PosTC1 + PosTC2 + PosPC3, **M4** = PosPC2 + PosTC3, **M5** = T/S, **M6** = A/S, **M7** = A/M, **M8** = T/S/A/M, **M9** = A/S/A/M, **M10** = T/S/A/M/A/S.

\*\***sm** = Mortalidade de sementes no banco, **e** = Emergência, **sdlsi<sub>1</sub>** = Sobrevivência de plântulas, **sdlsi<sub>2</sub>** = Sobrevivência de plântulas, **sdlsi<sub>3</sub>** = Sobrevivência de plântulas, **f** = Máxima produção de sementes por planta, **lp** = Perda na polinização, **sl** = Perda de sementes.

Modelos de dinâmica de populações são importantes para buscar o entendimento de populações a longo prazo. A fim de verificar a precisão do modelo, podem ser realizadas amostragens em condições reais para cada sistema de manejo e realizar a validação. O modelo permite que sejam inseridos parâmetros referentes ao custo de cada manejo, assim como as perdas potenciais em função da presença de plantas de azevém. Outra possibilidade é a incorporação da probabilidade da evolução da resistência, e a evolução sobre diferentes estratégias de manejo, permitindo fazer projeções futuras da evolução da resistência na área (MANALIL *et al.*, 2012).

As estratégias de cultivos utilizados indicam impacto elevado sobre o desenvolvimento de plantas de azevém, todavia, a repetição dos mesmos sistemas com os mesmos herbicidas pode ser prejudicial, pois neste caso aumentará a pressão de seleção e poderá selecionar plantas resistentes a herbicidas. Mesmo sistemas com sucessão de cultura devem utilizar rotação de mecanismo de ação herbicida para que a eficiência no controle de plantas não

seja afetada. Em suma, a diversificação das estratégias de manejo é fundamental para a prevenção e o controle de plantas daninhas resistentes a herbicidas.

## 5. CONCLUSÕES

Há elevada variabilidade de resposta das populações de azevém ao herbicida glyphosate, com valores de FR-GR<sub>50</sub> situando-se entre 1.37 e 5.50. Todavia, a maior proporção das plantas apresentam valores entre 2 e 4 (55%). As populações que apresentam os maiores níveis de resistência são PL07AR, PB01AR, RN02AR, NP03AR com respectivo FR-GR<sub>50</sub> de 4.97, 4.75, 4.96 e 5.50.

Os resultados destacam a importância da adoção de táticas de manejo preventivas, a fim de evitar a evolução da resistência a níveis mais elevados, assim como para evitar o surgimento de novos casos de resistência a herbicidas pertencentes a outros mecanismos de ação.

O estudo do mecanismo de resistência demonstra que a amplificação gênica é um dos mecanismos relacionados com a resistência de azevém ao glyphosate na Região Sul do Brasil. O aumento do número de cópias do gene pode variar de 4 a 33x superiores a das populações suscetíveis. O aumento do número de cópias do gene resulta em transcritos funcionais que aumentaram a expressão do gene da EPSPs de 6 a 24x em comparação às populações suscetíveis.

Pela ausência de evidências quanto ao mecanismo relacionado ao local de ação, sugere-se que a população VT05AR possua mecanismo não relacionado ao local de ação com a resistência ao glyphosate.

No que se refere a demografia pode-se concluir que sob condições de ambiente adequadas, a emergência de azevém pode ocorrer rapidamente (< 30 dias). A época de estabelecimento das plantas no ambiente apresenta efeito direto sobre a sobrevivência e caracteres relacionados a produção de sementes (espigas por planta e flores por espigueta). Os primeiros *cohorts* apresentam menor sobrevivência se comparado aos últimos, todavia, maior potencial de produção de espigas por planta. O terceiro *cohort* indica maior potencial de produção de flores por planta em detrimento aos dois primeiros. As plantas de azevém apresentam alto potencial de produção de sementes, todavia, pode ser severamente afetado em função da densidade de plantas.

A comparação entre as populações suscetível e resistente ao glyphosate demonstra que há poucas diferenças entre elas a nível demográfico, sendo caracterizado principalmente pelo potencial de produção de sementes por planta sob baixa densidade populacional.

O modelo de emergência proposto descreve com precisão o padrão de emergência do azevém em função do tempo termal do solo. O modelo foi validado com um conjunto de dados independente. Pode-se concluir que o modelo é suficientemente robusto para ser usado como uma ferramenta de previsão para descrever a emergência do azevém e pode ser usado como uma ferramenta de decisão para otimização de estratégias de manejo da espécie.

O banco de sementes de ambas as populações (suscetível ou resistente), tendem a se estabilizar em quantidades semelhantes em ambos os cenários climáticos.

Independentemente do cenário climático e da população, observa-se que entre as estratégias de manejo, as culturas que utilizam aveia no inverno são menos eficientes em reduzir o banco de sementes azevém, enquanto as que utilizam trigo de inverno ou milho de verão são mais eficientes na redução do banco de sementes da espécie.

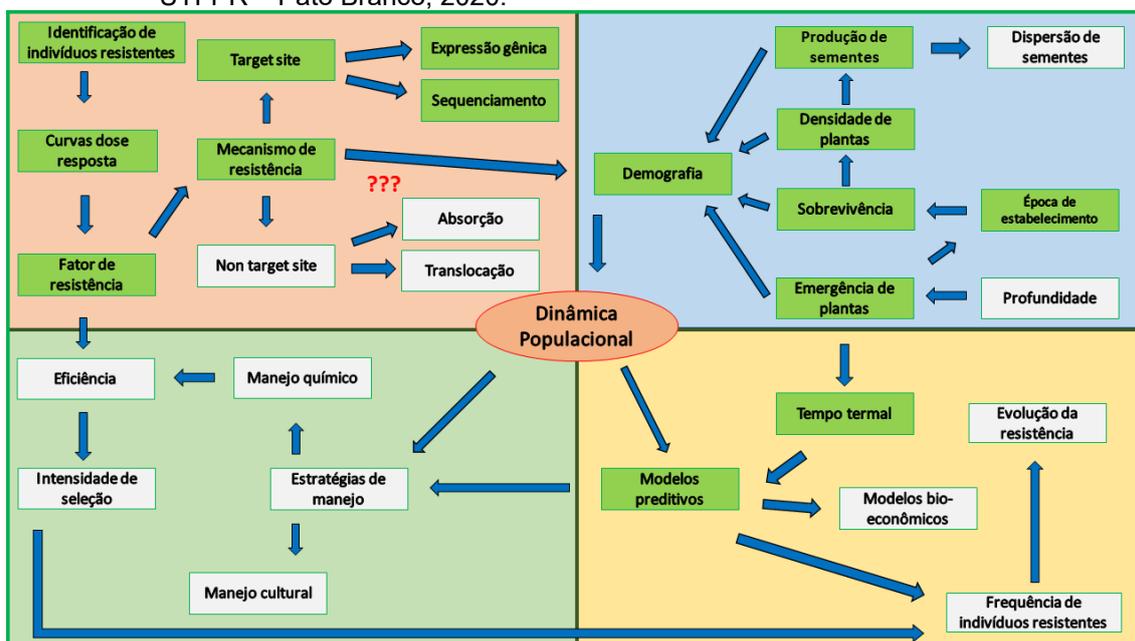
Independentemente da estratégia de manejo, o aumento da temperatura leva a um aumento do número de sementes no banco de sementes de ambas as populações, mas as estratégias de manejo dependentes do manejo químico tendem a ter sua eficiência reduzida.

A análise de sensibilidade mostra que as populações azevém são sensíveis a pequenas variações na fecundidade e polinização em ambos os cenários climáticos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta Tese foram abordados diferentes temas dentro da área de conhecimento das plantas daninhas, envolvendo desde o uso de técnicas de biologia molecular para verificar o mecanismo envolvido na resistência de azevém ao glyphosate até o uso de modelos matemáticos para descrever a dinâmica populacional da espécie. Na figura 24 é demonstrada uma rede semântica a qual engloba algumas das sub áreas de conhecimento do estudo da Ciência de Plantas Daninhas, no qual são destacados (caixa verde) alguns dos estudos realizados na presente tese. Ao centro se destaca a dinâmica populacional, pois a partir do seu conhecimento é possível obter um melhor entendimento do comportamento da comunidade infestante e adotar estratégias de manejo mais eficientes.

**Figura 24** - Rede semântica com algumas das sub áreas de conhecimento da Ciência de Plantas daninhas. Em destaque (caixas verdes), tópicos abrangidos na presente Tese. UTFPR – Pato Branco, 2020.



O entendimento da dinâmica populacional parte do conhecimento da demografia e da biologia da espécie. Conhecimentos básicos de características relacionadas ao ciclo das plantas, tais como emergência, sobrevivência e produção de sementes auxiliam na compreensão do padrão de

comportamento das plantas e conseqüentemente da dinâmica populacional da espécie. Conforme visto no presente estudo, a emergência de plântulas de azevém pode ser rápida sob condições adequadas. Todavia, áreas de lavouras são comumente expostas a sistemas de manejo variados, o próprio revolvimento do solo pode proporcionar o enterramento das sementes as quais, por apresentarem baixo nível de reserva e ausência de grossa estrutura de proteção (tegumento), apresentam baixo potencial de sobrevivência no solo, podendo ser deterioradas sem gerarem novas plântulas. A taxa de sobrevivência difere entre plantas que se estabelecem em diferentes épocas do ano (*cohorts*) e isto possivelmente é relacionado com as condições do ambiente. A época de estabelecimento das plantas também afeta os caracteres reprodutivos e conseqüentemente o potencial de produção de sementes. O número de indivíduos sobreviventes ao final do ciclo reprodutivo será o responsável pela perpetuação da espécie e, conforme observado neste estudo, a produção de sementes é fortemente regulada pela densidade de plantas. O azevém é uma espécie de polinização cruzada obrigatória, apesar de não ser estudada na presente tese, a taxa de polinização impacta diretamente na produção de sementes pelas plantas. A presença de barreiras físicas (ex. plantas cultivadas), ou até mesmo condições ambientais (baixa umidade, elevada radiação) ou biológicas (ausência de organismos polinizadores) desfavoráveis pode comprometer o potencial de produção de sementes da espécie. É importante destacar que as sementes da espécie possuem dormência, a qual é superada pelas altas temperaturas durante o verão no período denominado como pós secagem (“*after ripening*”). De fato, sementes maduras que se desprendem da planta mãe podem apresentar potencial de emergência logo ao atingirem o solo e prontamente gerar novos indivíduos ainda ao final da primavera. Todavia pela competição com outras plantas e ausência de condições ambientais ideais logo vem a sucumbir. Isto acaba impactando diretamente o banco de sementes da espécie.

A partir do melhor entendimento do comportamento das plantas (entendimento da dinâmica populacional) é possível aplicar estratégias de manejo mais eficientes, tanto em infestação com espécie única ou até mesmo em infestação mista. Comumente estratégias de manejo se baseiam em

ferramentas químicas ou culturais. Sabe-se da importância do manejo cultural como método conservacionista em aspecto ecológico e considerando principalmente a qualidade do solo. De fato, considerando especificamente o manejo de plantas daninhas, esta é uma estratégia indispensável. No que se refere ao manejo químico, apesar de uma ampla gama de herbicidas disponíveis, ocorre a limitação do uso de determinadas moléculas herbicidas em algumas circunstâncias. Exemplificando, grandes limitações seriam encontradas pelos agricultores para realizar o manejo de azevém resistente a três mecanismos de ação (EPSPs, ALS e ACCase) em áreas cultivadas com trigo, ou até mesmo o manejo de leiteiro resistente a dois mecanismos de ação (ALS e Protox) em pós emergência da cultura do feijão. Em ambos os casos se deveria optar pelo manejo anterior a semeadura da cultura com moléculas herbicidas que apresentam mecanismos de ação diferentes dos supracitados. É importante mencionar sobre o uso de herbicidas eficientes, que proporcionem uma boa taxa de controle. Todavia, deve-se atentar a pressão de seleção imposta por estes herbicidas, o que pode levar a seleção de novos indivíduos resistentes, agravando a problemática de plantas resistentes na área. Apesar da presente Tese não abordar diretamente estratégias de manejo, através do uso de modelos preditivos foram realizadas estimativas do comportamento da dinâmica populacional de azevém com diferentes estratégias de manejo, por meio de dados obtidos por estudos realizados por outros pesquisadores.

Os modelos de dinâmica de populações juntamente com os modelos preditivos e modelos de emergência poderiam atuar em sistemas de suporte de decisão e auxiliar a selecionar qual a estratégia de manejo melhor se adequa sob determinada circunstância. Modelos que descrevem a emergência de plântulas podem ser úteis para se identificar em qual condição as sementes estarão aptas a germinarem. Esta informação se tornaria importante principalmente considerando a utilização de herbicidas pré emergentes, pois o herbicida poderia ser aplicado em condição na qual maior proporção de plântulas apresenta potencial de emergência. O modelo desenvolvido baseado no acúmulo térmico do solo apresentou ser eficiente para descrever a emergência de azevém, e apresenta potencial para ser utilizado como ferramenta de suporte

de decisão para auxiliar no manejo da espécie. Todavia, para se obter um melhor entendimento do padrão de emergência de plântulas da espécie, encoraja-se que mais estudos sejam desenvolvidos, a coleta de dados em diferentes ambientes e em diferentes regiões poderia auxiliar no desenvolvimento de modelos mais robustos. No que se refere ao modelo de dinâmica de populações, dentre as estratégias de manejo empregadas é observado que grande parte destas apresentam alta eficiência (>80%) em suprimir o banco de sementes da espécie. O sistema que apresentou menos eficiente foi o relacionado com o cultivo consecutivo de aveia + soja (≈60%). Todavia, quando considera esta estratégia dentro de um sistema que engloba a rotação com diferentes culturas de verão (soja, milho) e diferentes culturas de inverno (aveia trigo) o potencial de supressão do banco de sementes se eleva. Isto reforça o fato de que a combinação de cultivos é a estratégia mais eficiente para o manejo de plantas daninhas. Com integração entre o modelo baseado no acúmulo térmico para descrever a emergência de plântulas e o modelo de dinâmica de populações foi possível fazer projeções do comportamento das populações suscetíveis e resistentes sob o efeito do câmbio climático, considerando o incremento da temperatura média estimada para a Região Sul do Brasil. O principal fato a ser observado com esta simulação é de que a capacidade de suporte do ambiente tende a aumentar. Em termos simples, devido a elevação da temperatura, o acúmulo térmico do solo tende ser mais rápido e estimular a germinação de plântulas mais rapidamente. Isto altera a dispersão temporal das plantas no ambiente reduzindo a competição interespecífica em *cohorts* mais tardios. Todavia, o aumento da temperatura impactaria diretamente no desenvolvimento morfofisiológico das plantas adultas, este é um fator interessante que poderia ser incorporado no modelo, todavia, a ausência de informações quanto ao desenvolvimento da espécie sobre estas circunstancia limitam a possibilidade. Apesar de não ser abordada na presente tese, outra possibilidade é o desenvolvimento de modelos bio-econômicos para determinar qual é a viabilidade da aplicação de estratégias de manejo, considerando do ponto de vista de eficiência e econômico, a curto e longo prazo. Tais modelos também poderiam ser utilizados para descrever a evolução da resistência, como a adoção

de determinada estratégia de manejo por vários ciclos poderia impactar na evolução de plantas resistentes em uma área de cultivo.

Com respeito a resistência de plantas daninhas a herbicidas, assim como no presente estudo, é ampla a literatura que descrevem os processos de identificação, coleta de sementes, verificação do nível de resistência através de curvas de resposta a doses de herbicidas e estudos dos mecanismos de resistência. Todavia, o que podemos aprender com o estudo dos mecanismos envolvidos na resistência? Alguns estudos tem demonstrado que plantas na qual o mecanismo de resistência ao glyphosate é a translocação reduzida, a eficiência do herbicida tende a ser maximizada quando a aplicação do herbicida é realizada em baixas temperaturas. Outra possibilidade apresentada por pesquisadores é o uso de *i*RNA no manejo das plantas resistentes, de fato, o conhecimento do mecanismo envolvido na resistência das plantas seria fundamental para a aplicação desta técnica. E qual seria o impacto da resistência sobre a demografia das plantas? Diversos estudos tem demonstrado a presença do custo adaptativo em plantas resistentes a herbicidas, todavia ainda são escassos os trabalhos que avaliam profundamente este efeito e seu impacto a nível populacional. Havia sido levantada a hipótese de que alguns mecanismos poderiam facilitar o desenvolvimento das plantas. Por exemplo, o aumento da expressão do gene da EPSPs poderia favorecer a síntese de metabolitos secundários, principalmente os que estão relacionados com a defesa da planta, desta forma em um ataque de pragas a planta resistente ao glyphosate poderia se sobressair sobre as suscetíveis. Por outro lado, o efeito negativo da resistência é mais fortemente caracterizado na literatura. Pesquisadores tem sugerido que a mutação no gene que codifica a enzima EPSPs afeta negativamente o desenvolvimento das plantas resistentes. Tem sido sugerido que o impacto do custo adaptativo em plantas resistentes é tão severo que poderia comprometer gravemente o desenvolvimento das plantas e que na ausência do produto selecionador (herbicida) as plantas seriam sucumbidas em meio as plantas suscetíveis. Referente ao nível de resistência das plantas a herbicidas, sugere-se que níveis elevados podem ser resultantes de mecanismos mais eficientes ou até mesmo da combinação de diferentes mecanismos. Por se tratar de uma proteína

(EPSPs) a qual é rota de cerca de 30% do carbono incorporado na planta, alterações no seu funcionamento podem impactar o desenvolvimento da planta, no entanto, para determinar o nível do impacto do custo adaptativo mais estudos devem ser conduzidos. Possivelmente uma melhor compreensão partiria do estudo de isolinhas de plantas resistentes, aonde que a base genética das plantas (suscetível e resistentes) são similares e a diferença no comportamento seria caracterizado principalmente pelo mecanismo de resistência.

Por fim esta tese trouxe avanços para o conhecimento da Ciência das Plantas Daninhas na pesquisa brasileira. No que se refere a mecanismos de resistência, este é o primeiro documento a relatar a amplificação gênica da EPSPs como mecanismo relacionado a resistência de uma espécie de planta daninha no Brasil.

Considerando o desenvolvimento de modelos de dinâmica de populações, no Brasil ainda são escassos os estudos com o tema. Modelos preditivos podem ser utilizados como ferramentas preditivas, auxiliando na tomada de decisão do manejo de plantas daninhas. De fato, estes modelos também podem auxiliar na redução de disseminação de plantas resistentes.

Espero que esta Tese, além das informações obtidas para o avanço do conhecimento da Ciência das Plantas Daninhas, também seja utilizada como fonte de inspiração para futuros pesquisadores dentro da área e que possam aprofundar os seus conhecimentos trazendo novas soluções para o campo.

## REFERÊNCIAS

- ADEGAS, F. S.; VARGAS, L.; GAZZIERO, D. L. P.; KARAM, D. Impacto econômico da resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil. In: Embrapa Soja-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: **CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS**, 31., 2018, Rio de Janeiro. Desafios e sustentabilidade no manejo de plantas daninhas: resumos. Londrina: SBCPD, 2018., 2018.
- 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. 48-54, 2013.
- ALARCÓN-REVERTE, R.; GARCÍA, A.; WATSON, S. B.; ABDALLAH, I.; SABATÉ, S.; HERNÁNDEZ, M. J.; FISCHER, A. J. Concerted action of target-site mutations and high EPSPS activity in glyphosate-resistant junglerice (*Echinochloa colona*) from California. **Pest Management Science**, v. 71, n. 7, p. 996-1007, 2015.
- ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R.; ROJANO-DELGADO, A. M.; GIMÉNEZ, M. J.; CRUZ-HIPOLITO, H. E.; DOMÍNGUEZ-VALENZUELA, J. A.; BARRO, F.; DE PRADO, R. First resistance mechanisms characterization in glyphosate-resistant *Leptochloa virgata*. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1742, 2016.
- ANDERSEN, L. E.; BREISINGER, C.; JEMIO, L. C.; MASON-D'CROZ, D. A. N. I. E. L.; RINGLER, C.; ROBERTSON, R.; WIEBELT, M. Climate change impacts and household resilience: **Prospects for 2050 in Brazil, Mexico, and Peru**. Intl Food Policy Res Inst, 2016.
- ARNOTT, R. A. The effect of seed weight and depth of sowing on the emergence and early seedling growth of perennial ryegrass (*Lolium perenne*). **Grass and Forage Science**, v. 24, n. 2, p. 104-110, 1969.
- BAGAVATHIANNAN, M.; NORSWORTHY, J.; SMITH, K.; NEVE, P. Modeling the evolution of glyphosate resistance in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in cotton-based production systems of the midsouthern United States. **Weed Technology**, v. 27, n. 3, p. 475-487, 2013.
- BARARPOUR, M. T.; NORSWORTHY, J. K.; BURGOS, N. R.; KORRES, N. E.; GBUR, E. E. Identification and biological characteristics of ryegrass (*Lolium* spp.) accessions in Arkansas. **Weed Science**, v. 65, n. 3, p. 350-360, 2017.
- BAUCOM R.S.; MAURICIO R. The evolution of novel herbicide tolerance in a noxious weed: the geographic mosaic of selection. **Evolutionary Ecology**, v. 22, n. 1, p. 85-101, 2008.

BERES, Z. T.; YANG, X.; JIN, L.; ZHAOW, M. D. M.; SNOW, A. A. Overexpression of a native gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) may enhance fecundity in *Arabidopsis thaliana* in the absence of glyphosate. **International Journal of Plant Sciences**, v. 179, n. 5, p. 390-401, 2018.

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

BORGER, C. P. D.; SCOTT, J. K.; WALSH, M.; POWLES, S. B. Demography of *Salsola australis* populations in the agricultural region of south-west Australia. **Weed research**, v. 49, n. 4, p. 391-399, 2009.

BRADFORD, K.J. Applications of hydrothermal time to quantifying and modeling seed germination and dormancy. **Weed Science**, v. 50, n. 2, p. 248-260, 2002.

BULINSKA-RADOMSKA, Z.; LESTER, R. Relationships between five species of *Lolium* (Poaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v.148, p.169-175. 1985.

BURGOS, N. R.; TRANEL, P. J.; STREIBIG, J. C.; DAVIS, V. M.; SHANER, D.; NORSWORTHY, J. K.; RITZ, C. Confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. **Weed Science**, v.1, n.1, p.4-20. 2013.

BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R.; HUYVAERT, K. P. AIC model selection and multimodel inference in behavioral ecology: some background, observations, and comparisons. **Behavioral ecology and sociobiology**, v. 65, n. 1, p. 23-35, 2011.

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, 2008.

CECHIN, J., PIASECKI, C., BENEMANN, D. P., KREMER, F. S., GALLI, V., MAIA, L. C., VARGAS, L. Transcriptome Analysis Identifies Candidate Target Genes Involved in Glyphosate-Resistance Mechanism in *Lolium multiflorum*. **Plants**, v. 9, n. 6, p.685, 2020

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.

COUSENS R.; DOYLE C. J.; WILSON B. J.; CUSSANS G. W.; Modelling the economics of controlling *Avena fatua* in winter wheat. **Pesticide Science**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 1986.

CULPEPPER, A. S.; GREY, T. L.; VENCILL, W. K.; KICHLER, J. M.; WEBSTER, T. M.; BROWN, S. M.; HANNA, W. W. Glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) confirmed in Georgia. **Weed Science**, v.54, p620–626.

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

DÉLYE, C.; MENCHARI, Y.; MICHEL, S.; CADET, É.; LE CORRE, V. A new insight into arable weed adaptive evolution: mutations endowing herbicide resistance also affect germination dynamics and seedling emergence. **Annals of botany**, v. 111, n. 4, p. 681-691, 2013.

DEREGIBUS, V. A.; CASAL, J. J.; JACOBO, E. J.; GIBSON, D.; KAUFFMAN, M.; RODRIGUEZ, A. M. Evidence that heavy grazing may promote the germination of *Lolium multiflorum* seeds via phytochrome-mediated perception of high red/far-red ratios. **Functional Ecology**, p. 536-542, 1994.

DILLON, A.; VARANASI, V. K.; DANILOVA, T. V.; KOO, D. H.; NAKKA, S.; PETERSON, D. E.; JUGULAM, M. Physical mapping of amplified copies of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene in glyphosate-resistant *Amaranthus tuberculatus*. **Plant physiology**, v. 173, n. 2, p. 1226-1234, 2017.

DORADO, J.; SOUSA, E.; CALHA, I.; GONZALEZ-ANDUJAR, J.; FERNÁNDEZ-QUINTANILLA, C. Predicting weed emergence in maize crops under two contrasting climatic conditions. **Weed Research**, v. 49, n. 3, p. 251-260, 2009.

ETTEN, M. L.; KUESTER, A.; CHANG, S. M.; BAUCOM, R. S. Fitness costs of herbicide resistance across natural populations of the common morning glory, *Ipomoea purpurea*. **Evolution**, v.70, n.10, p.2199-2210. 2016.

FANG, J.; NAN, P.; GU, Z.; GE, X.; FENG, Y.Q.; LU, B. R. Overexpressing exogenous 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) genes increases fecundity and auxin content of transgenic Arabidopsis plants. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 233, 2018.

FERNÁNDEZ-MORENO, P. T.; ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R.; 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, p. 1796, 2017.

FERNANDEZ-QUINTANILLA, C.; BARROSO, J.; RECASENS, J.; SANS, X.; TORNER, C.; SANCHEZ DEL ARCO, M. J. Demography of *Lolium rigidum* in winter barley crops: analysis of recruitment, survival and reproduction. **Weed Research**, v. 40, n. 3, p. 281-291, 2000.

FERREIRA, B. F.; PORTYA, P. C.; DENISMAR, A. N. ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portuguese). **R package version 1.2.0, 2018**. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=ExpDes.pt>>. Acesso em: 29 set. 2019.

FERREIRA, E. A.; SANTOS, J.B.; SILVA, A.A.; OLIVEIRA, J.A.; VARGAS, L. Translocação do glyphosate em biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*). **Planta Daninha**, v. 24, n. 2, p. 365-370, 2006.

FORCELLA, R.; BENECH, A.; SANCHEZ, R.; GHERSAB, C. M. Modeling seedling emergence. **Field Crops Research**, v. 67, n. 2, p. 123-139, 2000.

FRANS, R.; TALBOT, R.; MARX, D.; CROWLEY, H. Experimental design and techniques for measuring and analysing plant responses to weed control practices. In: Camper, N.D. **Research methods in weed science**. 3th ed. Champaign: SWSS, 1986. p.29-46.

GAINES, T. A.; ZHANG, W.; WANG, D.; BUKUN, B.; CHISHOLM, S. T.; SHANER, D. L.; GREY, T. L. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 3, p. 1029-1034, 2010.

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

GALVANI, J.; RIZZARDI, M. A.; CARNEIRO, C. M.; BIANCHI, M. A. Anatomia foliar de *Lolium multiflorum* sensível e resistente ao glyphosate. **Planta daninha**, v. 30, n. 2, p. 407-413, 2012.

GE, X.; D'AVIGNON, D. A.; ACKERMAN, J. J.; COLLAVO, A.; SATTIN, M.; OSTRANDER, E. L.; PRESTON, C. Vacuolar glyphosate-sequestration correlates with glyphosate resistance in ryegrass (*Lolium* spp.) from Australia, South America, and Europe: a <sup>31</sup>P NMR investigation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 5, p. 1243-1250, 2012.

GIACOMINI, D.; WESTRA, P.; WARD, S. M. Impact of genetic background in fitness cost studies: an example from glyphosate-resistant Palmer amaranth. **Weed Science**, v. 62, n. 1, p. 29-37, 2014.

GIGÓN, R.; VIGNA, M.; YANNICCARI, M.. **Manejo de malezas problema. Raigrás**. *Lolium* spp. 2017. Disponível em: < <http://www.aapresid.org.ar/rem-malezas/archivos/emergencias/documentos/gig-n-vigna-y-yanniccari-manejo-de-malezas-problema-raigr-s-lolium-spp.pdf>>. Acesso em: 11 jul 2019.

GIMÉNEZ, M. J.; PISTÓN, F.; ATIENZA, S. G. Identification of suitable reference genes for normalization of qPCR data in comparative transcriptomics analyses in the Triticeae. **Planta**, v. 233, n. 1, p. 163-173, 2011.

GONZÁLEZ DÍAZ, L. **Desarrollo de modelos de dinámica en poblaciones espacialmente explícitos para el manejo integrado a malas hierbas anuales en diferentes escalas espaciales**. Tese de doutorado, Córdoba p. 169, 2012

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-ANDUJAR, J. L.; FERNANDEZ-QUINTANILLA, C. Modelling the population dynamics of *Avena sterilis* under dry-land cereal cropping systems. **Journal of Applied Ecology**, p. 16-27, 1991.

GONZALEZ-ANDUJAR, J. L.; CHANTRE, G. R.; MORVILLO, C.; BLANCO, A. M.; FORCELLA, F. Predicting field weed emergence with empirical models and soft computing techniques. **Weed research**, v. 56, n. 6, p. 415-423, 2016.

GONZALEZ-ANDUJAR, J. L. Weed Control Models. In **Population Dynamics. Encyclopedia of Ecology**; Jørgensen, S., Fath, B., Eds.; Elsevier: Oxford, MS, USA, 2008; Volume 5, pp. 3776–3780. 2008

GONZÁLEZ-ANDUJAR, J. L.; FERNÁNDEZ-QUINTANILLA, C.; BASTIDA, F.; CALVO, R.; GONZÁLEZ DÍAZ, L.; IZQUIERDO, J.; LEZAUN, J.A.; PEREA, F.; SANCHEZ DEL ARCO, M. J.; URBANO, J. M. Field evaluation of a decision support system for herbicidal control of *Avena sterilis* ssp. *ludoviciana* in winter wheat. **Weed research**, v. 50, n. 1, p. 83-88, 2010.

GONZALEZ-ANDUJAR, J. L.; CHANTRE, G. R.; MORVILLO, C.; BLANCO, A. M.; FORCELLA, F. Predicting field weed emergence with empirical models and soft computing techniques. **Weed research**, v. 56, n. 6, p. 415-423, 2016.

GONZÁLEZ-DÍAZ, L.; LEGUIZAMÓN, E.; FORCELLA, F.; GONZÁLEZ-ANDUJAR, J. L. Integration of emergence and population dynamic models for long term weed management using wild oat (*Avena fatua* L.) as an example. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 5, n.2, p. 199-203, 2007.

GONZÁLEZ-TORRALVA, F.; GIL-HUMANES, J.; BARRO, 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, p. 16-22, 2012.

GREGOR, J. W. XXX.—Pollination and Seed Production in the Rye-Grasses (*Lolium perenne* and *Lolium italicum*). **Earth and Environmental Science Transactions of The Royal Society of Edinburgh**, v. 55, n. 3, p. 773-794, 1928.

GROTHENDIECK, G. nls2: **Non-linear regression with brute force**. R package version 0.2. 2013. Acesso em 30 jun 2020. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=nls2>

WICKHAM, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2016.

HADI, M. R.; HAJ, S.; GONZALEZ-ANDUJAR, J. L. Comparison of fitting weed seedling emergence models with nonlinear regression and genetic algorithm. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 65, n. 1, p. 19-25, 2009.

HAN, H.; YU, Q.; PURBA, E.; LI, M.; WALSH, M.; FRIESEN, S.; POWLES, S. B. A novel amino acid substitution Ala-122-Tyr in ALS confers high-level and broad resistance across ALS-inhibiting herbicides. **Pest management science**, v. 68, n. 8, p. 1164-1170, 2012.

HEAP, I. **The International Herbicide-Resistant Weed Database**. 2020. Acesso em: 20 jun 2020. Disponível em: [www.weedscience.org](http://www.weedscience.org)

HUANG, Z.; LIU, Y.; ZHANG, C.; JIANG, C.; HUANG, H.; WEI, S. Molecular basis of natural tolerance to glyphosate in *Convolvulus arvensis*. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

ICHIHARA, M.; YAMASHITA, M.; SAWADA, H.; ISHIDA, Y.; INAGAKI, H.; KIDA, Y.; ASAI, M. Dynamics of seedbank and seedling emergence of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) in wheat-soybean double cropped fields: a comparison between tilled and no-till systems. **Journal of Weed Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 16-25, 2010.

ICHIHARA, M.; YAMASHITA, M.; SAWADA, H.; KIDA, Y.; ASAI, M. Influence of after-ripening environments on the germination characteristics and seed fate of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). **Weed Biology and Management**, v. 9, n. 3, p. 217-224, 2009.

IZQUIERDO, J.; BASTIDA, F.; LEZAÚN, J. M.; SÁNCHEZ DEL ARCO, M. J.; GONZALEZ-ANDUJAR, J. L. Development and evaluation of a model for predicting *Lolium rigidum* emergence in winter cereal crops in the Mediterranean area. **Weed Research**, v. 53, n. 4, p. 269-278, 2013.

JASIENIUK, M.; AHMAD, R.; SHERWOOD, A. M.; FIRESTONE, J. L.; PEREZ-JONES, A.; LANINI, W. T.; 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.

JUGULAM, M.; NIEHUES, K.; GODAR, A. S.; KOO, D. H.; DANILOVA, T.; FRIEBE, B.; STAHLMAN, P. W. Tandem amplification of a chromosomal segment harboring 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase locus confers glyphosate resistance in *Kochia scoparia*. **Plant physiology**, v. 166, n. 3, p. 1200-1207, 2014.

KARN, E.; JASIENIUK, M. Nucleotide diversity at site 106 of EPSPS in *Lolium perenne* L. ssp. *multiflorum* from California indicates multiple evolutionary origins of herbicide resistance. *Frontiers in plant science*, v. 8, p. 777, 2017.

KARN, E.; BEFFA, R.; JASIENIUK, M. Variation in response and resistance to glyphosate and glufosinate in California populations of Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*). **Weed Science**, v. 66, n. 2, p. 168-179, 2018.

KAUNDUN, S. S.; DALE, R. P.; ZELAYA, I. A.; DINELLI, G.; MAROTTI, I.; MCINDOE, E.; CAIRNS, A. A novel P106L mutation in EPSPS and an unknown mechanism (s) act additively to confer resistance to glyphosate in a South African *Lolium rigidum* population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 3227-3233, 2011.

LEWANDROWSKI, W.; ERICKSON, T. E.; DIXON, K. W.; STEVENS, J. C. Increasing the germination envelope under water stress improves seedling emergence in two dominant grass species across different pulse rainfall events. **Journal of Applied Ecology**, v. 54, n. 3, p. 997-1007, 2017.

LOAGUE, K.; GREEN, R.E.; Statistical and graphical methods for evaluating solute transport models: overview and application. **Journal of contaminant hydrology**, v. 7, n. 1-2, p. 51-73, 1991.

LORENTZ, L.; GAINES, T. A.; NISSEN, S. J.; WESTRA, P.; STREK, H. J.; DEHNE, H. W.; BEFFA, R. Characterization of glyphosate resistance in *Amaranthus tuberculatus* populations. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 32, p. 8134-8142, 2014.

MAEDA, H.; AND DUDAREVA, N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. **Annual review of plant biology**, v. 63, p. 73-105, 2012.

MAIA, F. C.; MAIA, M. D. S.; BEKKER, R. M.; BERTON, R. P.; CAETANO, L. S. *Lolium multiflorum* seeds in the soil: I. Soil seed bank dynamics in a no til 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* seeds in the soil: II. longevity under natural conditions. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p. 123-128, 2009.

MALONE, J. M.; MORRAN, S.; SHIRLEY, N.; BOUTSALIS, P.; PRESTON, C. EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant *Bromus diandrus*. **Pest management science**, v. 72, n. 1, p. 81-88, 2016.

MANALIL, S.; RENTON, M.; DIGGLE, A.; BUSI, R.; POWLES, S. B. Simulation modelling identifies polygenic basis of herbicide resistance in a weed population and predicts rapid evolution of herbicide resistance at low herbicide rates. **Crop Protection**, v. 40, p. 114-120, 2012.

MCINNES, R.; LIDGETT, A.; LYNCH, D.; HUXLEY, H.; JONES, E.; MAHONEY, N. Isolation and characterization of a cinnamoyl-CoA reductase gene from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). **Journal of Plant Physiology**, v. 159, n. 4, p. 415-422, 2002.

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

MOLIN WT, WRIGHT AA, LAWTON-RAUH A, SASKI CA. The unique genomic landscape surrounding the EPSPS gene in glyphosate resistant *Amaranthus palmeri*: a repetitive path to resistance. **BMC genomics**, v. 18, n. 1, p. 91, 2017.

MYERS, M. W.; CURRAN, W. S.; VANGESSEL, M. J.; CALVIN, D. D. Predicting weed emergence for eight annual species in the northeastern United States. **Weed Science**, v. 52, n. 6, p. 913-919, 2004.

NANDULA, V. K.; WRIGHT, A. A.; BOND, J. A.; RAY, J. D.; EUBANK, T. W.; MOLIN, W. T. EPSPS amplification in glyphosate-resistant spiny amaranth (*Amaranthus spinosus*): a case of gene transfer via interspecific hybridization from glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). **Pest management science**, v. 70, n. 12, p. 1902-1909, 2014.

NEVE, P.; NORSWORTHY, J. K.; SMITH, K. L.; ZELAYA, I. A. Modelling evolution and management of glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Weed Research**, v. 51, n. 2, p. 99-112, 2011.

NGO, T. D.; MALONE, J. M.; BOUTSALIS, P.; GILL, G.; PRESTON, C. EPSPS gene amplification conferring resistance to glyphosate in windmill grass (*Chloris truncata*) in Australia. **Pest management science**, v. 74, n. 5, p. 1101-1108, 2018.

OREJA, F. H.; BASTIDA MILIÁN, F.; GONZÁLEZ ANDÚJAR, J. L. Simulation of control strategies for decision-making regarding *Digitaria sanguinalis* in glyphosate-resistant soybeans. **International Journal of Agriculture and Natural Resources**, v. 39, n. 2, p. 299-308, 2012.

OSIPITAN, O. A.; DILLE, J. A.; BAGAVATHIANNAN, M. V.; KNEZEVIC, S. Z. Modeling Population Dynamics of Kochia (*Bassia scoparia*) in Response to Diverse Weed Control Options. **Weed Science**, v. 67, n. 1, p. 57-67, 2019.

PATTERSON, E. L.; PETTINGA, D. J.; RAVET, K.; NEVE, P.; GAINES, T. A. Glyphosate resistance and EPSPS gene duplication: Convergent evolution in multiple plant species. **Journal of Heredity**, v. 109, n. 2, p. 117-125, 2018.

PAZUCH, D.; TREZZI, M. M.; GUIMARÃES, A. C. D.; BARANCELLI, M. V. J.; PASINI, R.; VIDAL, R. A. Evolution of natural resistance to glyphosate in morning glory populations. **Planta Daninha**, v. 35, 2017.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the KöppenGeiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences**, v. 11, n. 5, p. 1633-1644, 2007.

PEREZ-JONES, A.; PARK, K. W.; COLQUHOUN, J.; MALLORY-SMITH, C.; SHANER, D. Identification of glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Oregon. **Weed Science**, v. 53, n. 6, p. 775-779, 2005.

PEREZ-JONES, A.; PARK, K. W.; POLGE, N.; COLQUHOUN, J.; MALLORY-SMITH, C. A. Alejandro *et al.* Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. **Planta**, v. 226, n. 2, p. 395-404, 2007.

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

POWLES, S. B. Gene amplification delivers glyphosate-resistant weed evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 3, p. 955-956, 2010.

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.

PRIMAVESI, A. C.; RODRIGUES, A. D. A.; GODOY, R. Recomendações técnicas para o cultivo de aveia. Embrapa Pecuária Sudeste. **Boletim de pesquisa**. 2000.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2018. Acesso em: 20 jun 2020. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

RADOSEVICH, S. R.; HOLT, J.S.; GHERSA, C.M. **Ecology of weeds and invasive plants: relationship to agriculture and natural resource management**. 3th ed. New Jersey. John Wiley & Sons. 2007.

RITZ, C., STREIBIG, J. C. **Dose response curves and other nonlinear curves in Weed Science and Ecotoxicology with the add-on package drc in R**. Disponível em: [www. bioassay. Dk](http://www.bioassay.dk). Acesso em: 20 jun

ROYO-ESNAL, A.; NECAJEVA, J.; TORRA, J.; RECASENS, J.; GESCH, R. W. Emergence of field pennycress (*Thlaspi arvense* L.): Comparison of two accessions and modelling. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 161-169, 2015.

RSTUDIO TEAM. RStudio: **Integrated Development for R**. RStudio, Boston, United States. 2016. Disponível em: <http://www.rstudio.com/>. Acesso em: 20 jun 2020

RUIJTER, J. M.; RAMAKERS, C.; HOOGAARS, W. M. H.; KARLEN, Y.; BAKKER, O.; VAN DEN HOFF, M. J. B. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 6, p. e45-e45, 2009.

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* ssp. *multiflorum*) 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*) populations from Arkansas (United States). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 25, p. 5885-5893, 2015.

SAMMONS, R. D.; GAINES, T. A. Glyphosate resistance: state of knowledge. **Pest management science**, v. 70, n. 9, p. 1367-1377, 2014.

STEADMAN, K. J.; BIGNELL, G. P.; ELLERY, A. J. Field assessment of thermal after-ripening time for dormancy release prediction in *Lolium rigidum* seeds. **Weed Research**, v. 43, n. 6, p. 458-465, 2003.

TEDESCHI, L. O. Assessment of the adequacy of mathematical models. **Agricultural systems**, v. 89, n. 2-3, p. 225-247, 2006.

TERRELL, E. E. **A taxonomic revision of the genus *Lolium***. V. 1392. US Dept. of Agriculture. 1968.

THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE (2009) **AraCyc 5.0**. Disponível em: <http://www.plantcyc.org:1555/ARA/server.html>. Acesso em: 20 jun 2020.

TOZZI, E.; BECKIE, H.; WEISS, R.; GONZALEZ-ANDUJAR, J. L.; STORKEY, J., CICI, S. Z. H.; VAN ACKER, R. C. Seed germination response to temperature for a range of international populations of *Conyza canadensis*. **Weed research**, v. 54, n. 2, p. 178-185, 2014.

TRIBOUILLOIS, H.; DÜRR, C.; DEMILLY, D.; WAGNER, M. H.; JUSTES, E. Hélène *et al.* Determination of germination response to temperature and water potential for a wide range of cover crop species and related functional groups. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0161185, 2016.

TRUSLER, C. S.; PEEPER, T. F.; STONE, A. E. Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) management options in winter wheat in Oklahoma. **Weed Technology**, v. 21, n. 1, p. 151-158, 2007.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J.A.M; Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl\_2, p. W71-W74, 2007.

USDA, Agricultural Research Service, National Plant Germplasm System. Germplasm Resources Information Network (GRIN-Taxonomy). **National Germplasm Resources Laboratory**, Beltsville, Maryland. Disponível em: <<https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=22493>>. Acesso em: 29 set. 2019.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A., Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. research0034. 1, 2002.

VARANASI, A.; PRASAD, P. V.; JUGULAM, M. Impact of climate change factors on weeds and herbicide efficacy. In: **Advances in agronomy**. Academic Press, 2016. p. 107-146.

VARGAS, L.; ROMAN, E. S.; RIZZARDI, M. A.; SILVA, V. C. Identificação de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) resistentes ao herbicida glyphosate em pomares de maçã. **Planta daninha**, v. 22, n. 4, p. 617-622, 2004.

VARGAS, L.; RUCHEL, Q.; AGOSTINETTO, D.; LAMEGO, F. P.; LANGARO, A. C.; PIESANTI, S. R. Verification of the mechanism of glyphosate resistance in italian ryegrass biotypes. **Planta Daninha**, v. 34, n. 3, p. 565-573, 2016.

VARGAS, L.; ROMAN, E. S.; RIZZARDI, M. A.; MATTEI, R. W. 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.

VILA-AIUB, M. M.; YU, Q.; POWLES, S. B. Do plants pay a fitness cost to be resistant to glyphosate?. **New Phytologist**, v. 223, n. 2, p. 532-547, 2019.

VILA-AIUB, M. M.; NEVE, P.; STEADMAN, K. J.; POWLES, S. B. Ecological fitness of a multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* population: dynamics of seed germination and seedling emergence of resistant and susceptible phenotypes. **Journal of Applied Ecology**, v.42, n.2, p.288-298. 2005.

WAKELIN, A. M.; PRESTON, C. A. target-site mutation is present in a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population. **Weed Research**, v. 46, n. 5, p. 432-440, 2006.

WICKHAM, H. ggplot2: **Elegant Graphics for Data Analysis**. Springer-Verlag New York, 2016.

WIERSMA, A. T.; GAINES, T. A.; PRESTON, C.; HAMILTON, J. P.; GIACOMINI, D.; BUELL, C. R.; 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.

JUN-WANG, X. U.; XIAO-LI, W.; XU-GANG, L.; LEI, C.; DE-JIANG, F.; ZHEN, Z. Isolation of rice EPSP synthase cDNA and its sequence analysis and copy number determination. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 44, n. 2, p. 188-192, 2002.

YANG, J.; GREENWOOD, D.; ROWELL, D.; WADSWORTH, G.; BURNS, I. Statistical methods for evaluating a crop nitrogen simulation model, N\_ABLE. **Agricultural Systems**, v. 64, n. 1, p. 37-53, 2000.

YANNICCARI, M.; GÓMEZ-LOBATO, M. E.; ISTILART, C.; NATALUCCI, C.; GIMÉNEZ, D. O.; CASTRO, A. M. Mechanism of Resistance to Glyphosate in *Lolium perenne* from Argentina. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 5, p. 123, 2017.

YANNICCARI, M.; VILA-AIUB, M.; ISTILART, C.; ACCIARESI, H.; CASTRO, A. M. Glyphosate resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) is associated with a fitness penalty. **Weed Science**, v.64, n.1, p.71-79. 2016.

YOUSEFI, A. R.; OVEISI, M.; GONZALEZ-ANDUJAR, J. L. Prediction of annual weed seed emergence in garlic (*Allium sativum* L.) using soil thermal time. **Scientia Horticulturae**, v. 168, p. 189-192, 2014.

YU, Q.; JALALUDIN, A.; HAN, H.; CHEN, M.; SAMMONS, R. 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.; HAN, H.; LI, M.; PURBA, E.; WALSH, M. J.; POWLES, S. B. Resistance evaluation for herbicide resistance—endowing acetolactate synthase (ALS) gene mutations using *Raphanus raphanistrum* populations homozygous for specific ALS mutations. **Weed research**, v.52, n.2, p.178-186, 2012.

ZAMBRANO-NAVEA, C.; BASTIDA, F.; GONZALEZ-ANDUJAR, J. L. A hydrothermal seedling emergence model for *Conyza bonariensis*. **Weed Research**, v. 53, n. 3, p. 213-220, 2013.

ZAMBRANO-NAVEA, C.; BASTIDA, F.; GONZALEZ-ANDUJAR, J. L. A cohort-based stochastic model of the population dynamic and long-term management of *Conyza bonariensis* in fruiting tree crops. **Crop Protection**, v. 80, p. 15-20, 2016.

ZAMBRANO-NAVEA, C., BASTIDA, F.; GONZALEZ-ANDUJAR, J. L. Demography of *Conyza bonariensis* (Asteraceae) in a ruderal Mediterranean habitat. **Phytoparasitica**, v. 46, n. 2, p. 263-272, 2018.

ZISKA, L. H.; MCCONNELL, L. L. Climate change, carbon dioxide, and pest biology: monitor, mitigate, manage. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 1, p. 6-12, 2016.