

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

**VARIABILIDADE GENÉTICA E OCORRÊNCIA DE BIÓTIPOS DE
AZEVÉM COM SUSPEITA DE RESISTÊNCIA AO GLYPHOSATE NA
REGIÃO DE GUARAPUAVA/PR E ESTRATÉGIAS TECNOLÓGICAS
DE MANEJO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DARWIN CALEFF RAMOS

GUARAPUAVA-PR

2015

DARWIN CALEFF RAMOS

**VARIABILIDADE GENÉTICA E OCORRÊNCIA DE BIÓTIPOS DE AZEVÉM COM
SUSPEITA DE RESISTÊNCIA AO GLYPHOSATE NA REGIÃO DE
GUARAPUAVA/PR E ESTRATÉGIAS TECNOLÓGICAS DE MANEJO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Cleber Daniel de Goes Maciel

Orientador

Prof. Dr. Paulo Roberto da Silva

Co-orientador

GUARAPUAVA-PR

2015

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

R175v

Ramos, Darwin Caleff

Variabilidade genética e ocorrência de biótipos de azevém com suspeita de resistência ao glyphosate na região de Guarapuava/PR e estratégias tecnológicas de manejo / Darwin Caleff Ramos. -- Guarapuava, 2015

xiv, 62 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, 2015

Orientador: Cleber Daniel de Goes Maciel

Co-orientador: Paulo Roberto da Silva

Banca examinadora: Luiz Alberto Kozłowski, Sidnei Osmar Jadoski

Bibliografia

1. Agronomia. 2. Produção vegetal. 3. *Lolium perene* ssp.. 4. Multiflorum. 5. Marcador molecular. 6. Controle. 7. Inibidores de ACCase. 8. Tecnologia de aplicação. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

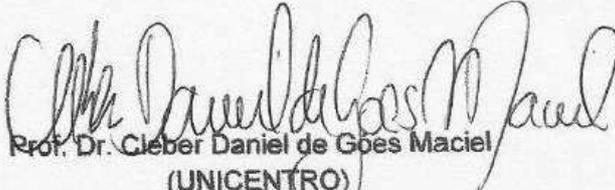
CDD 633.2

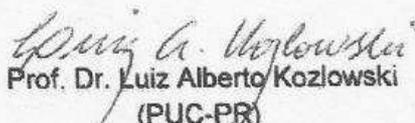
Darwin Caleff Ramos

VARIABILIDADE GENÉTICA E OCORRÊNCIA DE BIÓTIPOS DE AZEVÉM COM SUSPEITA
DE RESISTÊNCIA AO GLYPHOSATE NA REGIÃO DE GUARAPUAVA E ESTRATÉGIAS
TECNOLÓGICAS DE MANEJO

Dissertação apresentada à Universidade
Estadual do Centro-Oeste, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, área de concentração em Produção
Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 30 de julho de 2015.


Prof. Dr. Cleber Daniel de Góes Maciel
(UNICENTRO)


Prof. Dr. Luiz Alberto Kozłowski
(PUC-PR)


Prof. Dr. Sidnei Osmar Jadoski
(UNICENTRO)

GUARAPUAVA-PR

2015

À minha mãe, Rosa e meu avô, Alexandre.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar e proteger meu caminho, e me dar força para superar mais essa etapa na minha formação profissional.

À minha esposa Angela, às filhas Anny e Angye, pelo carinho e amor, pela companhia, por sua paciência, apoio e incentivo nos momentos difíceis.

Ao amigo e orientador, Prof. Dr. Cleber Daniel de Goes Maciel, pela oportunidade, orientação e confiança, pelo exemplo de mestre e pelos conhecimentos transmitidos nesta etapa.

Ao co-orientador Prof. Dr. Paulo Roberto da Silva, pela ajuda no capítulo II desta dissertação.

Aos colegas de Pós-graduação, João Igor de Souza, André Augusto Pazzinato da Silva, Renata Nussoi Giacomim e Lívia Costa Mariano pela ajuda em muitas etapas do trabalho.

Aos acadêmicos de Agronomia da UNICENTRO, Rafael Ravaneli Chagas e Lucas Geaning N. V. de Lima, pela ajuda prestada nos experimentos.

À Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela estrutura física e profissional durante minha formação.

Aos colegas e professores do Mestrado em Agronomia da UNICENTRO, que muito contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal.

A todos meus amigos, por compartilharmos alegrias e tristezas, pelos inúmeros momentos de companheirismo e solidariedade.

Aos funcionários de campo, Elias, Manoel e Ângelo pelo apoio e suporte prestados.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UNICENTRO, Juliana e Lucília, pela ajuda em muitos momentos, sempre muito alegres e pacientes.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram e auxiliaram para que esse trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	ix
Resumo	xi
Abstract	xii
1. Introdução	1
2. Objetivo(s)	2
2.1. Geral	2
2.2. Específico	2
3. Referencial Teórico	3
3.1. Caracterização do azevém e origem da resistência a herbicidas.....	3
3.2. Definição da resistência de plantas daninhas a herbicidas.....	5
3.3. Casos de resistências de plantas daninhas a herbicidas: situação Brasil e Mundo.....	5
3.4. Diversidade genética e resistência a herbicidas de plantas de azevém.....	7
3.5. Estratégias de manejo da resistência a herbicidas: misturas em tanque.....	8
3.5.1 Herbicidas alternativos no manejo do azevém resistente ao glyphosate.....	9
3.5.2 Uso de adjuvantes na qualidade da aplicação de dessecação do azevém.....	10
4. Referências Bibliográficas	11
5. Capítulo I	17
Resumo	17
Abstract	18
5.1. Introdução.....	19
5.2. Materiais e Métodos	20
5.3. Resultados e Discussão	24
5.4. Conclusão	29
5.5. Referências Bibliográficas	30
6. Capítulo II	34
Resumo	34
Abstract	35
6.1. Introdução.....	36
6.2. Materiais e Métodos	38
6.3. Resultados e Discussão	40
6.4. Conclusão	43
6.5. Referências Bibliográficas	43
7. Capítulo III	47
Resumo	47
Abstract	48
7.1. Introdução.....	49
7.2. Materiais e Métodos	50
7.3. Resultados e Discussão	53
7.4. Conclusão	57
7.5. Referências Bibliográficas	58
8. Considerações Finais	62

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Dados meteorológicos referentes ao período de desenvolvimento das avaliações nas três localidades estudadas. Guarapuava - PR, 2013.....21

Capítulo II

Figura 1. Gel de agarose com o padrão de amplificação do *primer* ISSR UBC 856 nos 30 genótipos de azevém. Os genótipos 1 a 15 e 16 a 30 são resistentes e suscetíveis ao herbicida glyphosate, respectivamente. A letra M indica o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb, enquanto a seta no lado esquerdo indica o fragmento de 600 pb do DNA Ladder....40

Figura 2. Dendrograma de similaridade das duas populações de azevém construído com base no índice de Jaccard e agrupado pelo método UPGM. A letra “R” Indica genótipos resistentes ao glyphosate e a letra “S” genótipos suscetíveis.....42

Capítulo III

Figura 1. Dados climatológicos referentes aos meses de maio a julho de 2013, período no qual foram conduzidas as avaliações. Guarapuava - PR, 2013.....51

Figura 2. Frequências acumuladas da deposição (A, B, C) e média total (D) da deposição da calda de pulverização em plantas de azevém utilizando associações de glyphosate Glyphosate (RWG) com ou sem os herbicidas inibidores da ACCase (Clethodim, Quizalofop-P-Tefuril) e adjuvantes (Assist[®], TA35[®] e Orobor N1[®]). Guarapuava - PR, 2013.....55

Figura 3. Frequências acumuladas da deposição (A, B, C) e média total (D) da calda de pulverização em plantas de azevém utilizando associações de glyphosate com ou sem os herbicidas inibidores da ACCase (clethodim, quizalofop-p-tefuril) e adjuvantes (Assist[®], TA35[®] e Orobor N1[®]). Guarapuava - PR, 2013. (20 repetições dados originais).....56

Figura 4. Tensão superficial estática da calda de pulverização com associações de glyphosate Glyphosate (RWG) com e sem herbicidas inibidores da ACCase (clethodim, quizalofop-p-tefuril) e adjuvantes (Assist[®], TA35[®] e Orobor N1[®]). Guarapuava, 2013.....57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de plantas daninhas resistentes ao glyphosate identificadas no mundo....06

Capítulo I

Tabela 1. Disposição dos tratamentos, doses e respectivas condições meteorológicas no momento das aplicações para avaliação do manejo do azevém (*L. multiflorum*) na região de Guarapuava-PR. Guarapuava, PR - 2013. (Experimento 1).....22

Tabela 2. Disposição dos tratamentos, doses e respectivas condições meteorológicas no momento das aplicações para avaliação do manejo do azevém (*L. multiflorum*) em condição de casa de vegetação e ambiente natural. Guarapuava, PR - 2013. (Experimento 2).....23

Tabela 3. Controle (%) de azevém (*L. multiflorum*) aos 7, 14, 21 e 35 dias após a aplicação (DAA) em três localidades da região de Guarapuava-PR. Guarapuava, PR - 2013. (Experimento 1).....25

Tabela 4. Matéria seca da parte aérea de azevém (*L. multiflorum*) aos 35 dias após a aplicação (DAA) dos tratamentos herbicidas em três localidades da região de Guarapuava-PR. Guarapuava, PR - 2013. (Experimento 1).....27

Tabela 5. Controle (%) de azevém (*L. multiflorum*) com 2 a 3 perfilhos em casa de vegetação e 5 a 7 perfilhos em ambiente natural aos 15 e 30 dias após a aplicação (DAA), utilizando plantas coletadas no Experimento 1, não controladas com o glyphosate (6,0 kg pc ha⁻¹). Guarapuava, PR - 2013. (Experimento 2).....29

Capítulo II

Tabela 1. Características dos *primers* ISSR utilizados para as análises das populações de azevém resistente e suscetível ao herbicida glyphosate, representadas pela temperatura de anelamento (TA), número total de fragmentos amplificados (NTF), número de fragmentos polimórficos (NTP) e porcentagem de polimorfismo (%P).....41

Capítulo III

Tabela 1. Tratamentos e doses realizadas para dessecação do azevém com suspeita de resistência ao glyphosate, Guarapuava, PR - 2014.....52

Tabela 2. Percentual de controle de azevém (*Lolium perene ssp. multiflorum*) aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a aplicação (DAA) de associações de Glyphosate com ou sem herbicidas inibidores da ACCase (Clethodim, Quizalofop-P-Tefurilico) e adjuvantes (Assist[®], TA35[®] e Orobor N1[®]). Guarapuava - PR, 2014.....55

RESUMO

RAMOS, Darwin Caleff. **Variabilidade genética e ocorrência de biótipos de azevém com suspeita de resistência ao glyphosate na região de Guarapuava/PR e estratégias tecnológicas de manejo**. Guarapuava: UNICENTRO, 2015. 62f. (Dissertação - Mestrado em Produção Vegetal)*.

O trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar na região de Guarapuava/PR se existem biótipos de azevém resistentes a herbicida de diferentes mecanismos de ação; caracterizar o grau de similaridade genética entre acessos de azevém suscetíveis e resistentes ao glyphosate e avaliar a eficiência de alternativas de controle de azevém em área com suspeita de resistência ao glyphosate, utilizando diferentes combinações de herbicidas e adjuvantes. Três experimentos foram conduzidos em campo e laboratório no município de Guarapuava/PR, durante as safras de 2013 e 2014, na Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO. Os tratamentos obedeceram ao delineamento experimental de blocos ao acaso. No experimento 1, utilizou-se a campo um fatorial $5 \times 3 + 1$, com 5 herbicidas (glyphosate 4320 g ha⁻¹; iodosulfurom-methyl 7,5 g ha⁻¹; clethodim 192 g ha⁻¹; quizalofop-p-tefuril 240 g ha⁻¹ e paraquat 600 g ha⁻¹), 3 localidades (Unicentro, Entre Rios e Palmeirinha) e uma testemunha. Em um segundo trabalho um fatorial $3 \times 2 + 1$, com 3 herbicidas (glyphosate com 2160 e 4320 g ha⁻¹, iodosulfurom-methyl 12,5 e 25,0 g ha⁻¹, clethodim 192 e 384 g ha⁻¹), conduzidos em casa de vegetação e ambiente natural, e uma testemunha. A presença de azevém como maior suspeita de ser resistente ao glyphosate foi apenas identificado em uma das localidades (Unicentro, *Campus* CEDETEG). Os herbicidas paraquat, clethodim e quizalofop-p-tefuril controlaram eficientemente o azevém com suspeita de resistência ao glyphosate, na região de Guarapuava/PR. No experimento 2, plantas resistentes e suscetíveis foram coletadas da localidade com a presença de plantas resistentes, sendo avaliados o DNA utilizando sete marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). Foi observada similaridade genética de 34% entre as plantas de azevém resistentes ao herbicida glyphosate e 38% entre plantas suscetíveis. Os resultados demonstraram que existe moderada diversidade genética na população resistente de azevém. No experimento 3, dois experimentos foram conduzidos a campo e laboratório, contendo 12 tratamentos constituído por: glyphosate (1440 g ha⁻¹),

* Orientador: Cleber Daniel de Goes Maciel - UNICENTRO-PR.

clethodim (120 g ha⁻¹), quizalofop-p-tefural (100 g ha⁻¹), glyphosate + clethodim (1440 + 120 g ha⁻¹), glyphosate + quizalofop-p-tefural (1440 + 100 g ha⁻¹), associado aos adjuvantes Assist[®] (1,0 L ha⁻¹) e TA35[®] (0,1 L ha⁻¹), glyphosate (1440 g ha⁻¹) associado ao adjuvante Orobor N1[®] (0,1 L ha⁻¹) e uma testemunha sem aplicação. As misturas de glyphosate com clethodim ou quizalofop-p-tefural, ou mesmo clethodim ou quizalofop-p-tefural isolados, foram eficientes no controle do azevém, com destaque para a rápida ação inicial do glyphosate + clethodim, independentemente do adjuvante utilizado. Para todos os tratamentos não foram caracterizadas diferenças significativas entre a frequência de deposição total ou média da pulverização nas folhas de azevém, embora os resultados sugiram que a presença dos herbicidas inibidores de ACCase (clethodim e quizalofop-p-tefural) podem influenciar no aumento da deposição da pulverização sobre as plantas de azevém.

Palavras-chave: *Lolium perene* ssp. multiflorum, marcador molecular, controle, Inibidores de ACCase, tecnologia de aplicação.

ABSTRACT

RAMOS, Darwin Caleff. **Genetic variability and occurrence of ryegrass resistant biotypes to glyphosate at Guarapuava region Parana State and management technologies strategies.** Guarapuava: UNICENTRO, 2015. 62f. (Dissertation - Master in Plant Production)*.

The work was performed in order to evaluate in Guarapuava region, Parana State, if there are resistant ryegrass biotypes to herbicides with different mechanisms of action; characterize the degree of genetic similarity between ryegrass accesses susceptible and resistant to glyphosate and verify the efficiency and quality of glyphosate application and ACCase inhibitors herbicide with adjuvant in desiccation management. Three experiments were conducted in field and laboratory conditions in Guarapuava County, Parana State, during 2013 and 2014 seasons, at Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO. Treatments were disposed in randomized blocks design. In experiment 1, it was used a factorial scheme in field conditions $5 \times 3 + 1$, with 5 herbicides (glyphosate 4320 g ha^{-1} ; iodosulfurom-methyl $7,5 \text{ g ha}^{-1}$; clethodim 192 g ha^{-1} ; quizalofop-p-tefuril 240 g ha^{-1} e paraquat 600 g ha^{-1}), three localities (Unicentro, Entre Rios and Palmeirinha) and a check. In a second work a $3 \times 2 + 1$ factorial with 3 herbicide (glyphosate 4320 g ha^{-1} ; iodosulfurom-methyl 7.5 g ha^{-1} ; clethodim 192 g ha^{-1} ; quizalofop-p-tefuril 240 g ha^{-1} e paraquat 600 g ha^{-1}), three locations (Unicentro, Entre Rios and Palmeirinha) and a check. In a second work in factorial scheme $3 \times 2 + 1$ with 3 herbicides (glyphosate with 2160 and 4320 g ha^{-1} , iodosulfurom-methyl 12.5 and 25.0 g ha^{-1} , clethodim 192 and 384 g ha^{-1}), conducted under greenhouse conditions and natural environment, and a check. The presence of ryegrass resistant to glyphosate ryegrass was identified only in one of the locations (Unicentro, CEDETEG *Campus*). Paraquat, clethodim and quizalofop-p-tefuril herbicides efficiently controlled resistant ryegrass with suspected to glyphosate resistance, in Guarapuava region, Parana State. In experiment 2, resistant and susceptible plants were collected from locality containing resistant plants, being DNA evaluated by using ISSR seven markers (Inter Simple Sequence Repeat). It was observed genetic similarity of 34% between resistant ryegrass plants to glyphosate herbicide and 38% the susceptible ones. Results showed that there is moderate genetic diversity in resistant

* Adviser: Cleber Daniel de Goes Maciel - UNICENTRO-PR.

ryegrass population. In experiment 3, two studies were carried out in field and laboratory conditions, containing 12 treatments consisting by: glyphosate (1440 g ha⁻¹), clethodim (120 g ha⁻¹), quizalofop-p-tefuriil (100 g ha⁻¹), glyphosate + clethodim (1440 + 120 g ha⁻¹), glyphosate + quizalofop-p-tefuriil (1440 + 100 g ha⁻¹), associated to Assist[®] adjuvant (1.0 L ha⁻¹) and TA35[®] (0.1 L ha⁻¹), Glyphosate (1440 g ha⁻¹) associated to Orobor adjuvant N1[®] (0.1 L ha⁻¹) and a check without application. Tank mixtures of glyphosate with clethodim or quizalofop-p-tefuriil or even clethodim or quizalofop-p-tefuriil isolated were efficient in controlling ryegrass, highlighting the fast initial action of glyphosate + clethodim, regardless of used adjuvant. For all treatments have not been identified significant differences between frequency of total deposition or medium spraying in ryegrass leaves. The results suggest that the presence of these ACCase inhibitors herbicide (clethodim and quizalofop-p-tefuriil) may influence over the increasing of spray deposition on ryegrass plants.

Key-words: *Lolium perene ssp. multiflorum*, molecular marker, control, ACCase inhibitors, application technology.

1. INTRODUÇÃO

O azevém anual (*Lolium perene multiflorum* Lam.) é uma gramínea originária do Mediterrâneo, considerada altamente adaptada às condições edafo-climáticas do Sul do Brasil. Mais lento na sua formação, contudo permite uma utilização mais prolongada em relação às aveias. Este conhecimento é importante para se adequar o ciclo da gramínea de inverno com o ciclo da cultura de verão. Ainda, quando utilizado em pastejo, após a saída dos animais, o azevém tem a capacidade de ressemeadura antes de sua dessecação, estando assim assegurado seu retorno no ano seguinte, com redução de gastos na aquisição de sementes. É uma das gramíneas hibernais mais cultivadas Sul do Brasil, tanto para ceifa como para pastagens cultivadas. Amplamente utilizada por produtores, devido suas características e usos (produção de forragem, boa rebrotação, resistente ao pastejo e ao excesso de umidade, suporta altas lotações animal, alto valor nutritivo, boa palatabilidade e alta ressemeadura natural).

Embora o azevém também seja utilizado como espécie forrageira durante o inverno, ele pode se constituir em planta daninha em culturas como trigo e milho. Além disso, plantas voluntárias é fonte de permanência das sementes e de infestações futuras, quando da utilização destas na prática de rotação de culturas de cereais de inverno, como cevadas, centeio, trigo e tritcale, onde o surgimento de biótipos resistentes a herbicidas tem sido relatado.

O surgimento de plantas daninhas resistentes a herbicidas deve-se, entre outros fatores, à repetida e continuada utilização de produtos com o mesmo mecanismo de ação. Deste modo, biótipos sofrem elevada pressão de seleção com esses herbicidas, contrariando um dos objetivos a ser alcançado no manejo integrado de plantas daninhas que é a prevenção da seleção de biótipos resistentes. Logo, é importante que a presença de biótipos resistentes a herbicidas seja detectada rapidamente, para se estabelecer estratégias de manejo adequadas.

Em vista disto, a biologia molecular vem-se tornando uma importante ferramenta nos estudos com plantas daninhas. Pesquisas sobre a variabilidade genética com o uso de marcadores moleculares permitem estimar a variabilidade genética dentro e entre espécies. Portanto, essas técnicas de marcadores moleculares aliadas ao sequenciamento conseguem localizar genes de resistência, assim como possíveis mutações relacionadas ao surgimento de indivíduos resistentes em determinadas espécies.

A dessecação do azevém para posterior plantio de lavouras é uma prática imprescindível, pois, falhas neste processo podem causar perdas de produtividade para as culturas seguintes, principalmente na cultura do trigo, onde muitas vezes a planta daninha já

está estabelecida antes do plantio da cultura. O manejo de pré-plantio com glyphosate (inibidor da enzima enol piruvato shiquimato fostato sintase - EPSPs) é de uso comum entre os produtores na região do município de Guarapuava-PR, onde, nos últimos anos, têm enfrentado dificuldades para controle do azevém, existindo relatos de resistência desta gramínea a esse referido herbicida. Em virtude desses relatos, foram realizados experimentos a campo e em casa de vegetação para verificar se existe populações de azevém resistentes a esse herbicida ou se tais dificuldades são consequência de falha no manejo de dessecção.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência de biótipos de azevém (*L. multiflorum*) com suspeita de resistência ao herbicida glyphosate, na região de Guarapuava-PR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a ocorrência de biótipos de azevém com suspeita de resistência ao glyphosate na região de Guarapuava-PR, assim como se existe um comportamento similar quando submetidos ao controle químico.

Determinar a variabilidade genética de duas populações de azevém utilizando marcadores ISSR e avaliar se há estruturação entre a população resistente e suscetível ao herbicida glyphosate.

Avaliar a eficiência de alternativas de controle de azevém em área do município de Guarapuava-PR com suspeita de resistência ao glyphosate, utilizando diferentes combinações de herbicidas e adjuvantes.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Caracterização do azevém e origem da resistência a herbicidas

Originário do Sul da Europa, norte da África e oeste da Ásia, o azevém (*L. multiflorum*) anual foi introduzido na região Sul do Brasil por imigrantes, em torno de 1875, estando hoje largamente disseminado nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e nas regiões frias do Paraná (NELSON et al., 1997). O azevém é uma espécie gramínea de ciclo anual, da família Poaceae, constituindo fecundação cruzada, folhas finas e tenras, crescimento cespitoso e agressivo, de 30 a 90 cm de altura. Com frequência, se constitui, em planta indesejada em lavouras de milho, centeio, triticale, soja e principalmente na cultura do trigo no Sul do Brasil (KISSMANN, 1997; ROMAN et. al., 2004; LORENZI, 2008).

O germoplasma de azevém utilizado pela maioria dos produtores é diplóide, denominado azevém comum. Entretanto, alguns produtores vêm utilizando cultivares tetraplóides, que apresentam algumas características diferentes do azevém diplóide, como por exemplo, sementes maiores, as folhas mais largas e de coloração mais escura. Dors et al. (2010), avaliaram o grau de tolerância dos genótipos diplóides e tetraplóides de azevém ao herbicida glyphosate, e constataram que os diplóide apresentaram suscetibilidade diferencial ao glyphosate, sendo o tetraplóide 1,6 vezes mais tolerante em relação ao diploide.

A maioria dos genótipos tetraplóides de azevém foi desenvolvido no Uruguai (NORO et al., 2003) e introduzida nos estados do Sul do Brasil por agropecuaristas próximos das fronteiras. Além da tolerância diferenciada entre genótipos diploides e tetraploides, existe uma interação entre a dose do herbicida e o estágio fenológico sobre a eficácia de controle da planta de azevém (RIBEIRO et al., 2008; DORS et al., 2010). Quanto mais avançado o estágio fenológico da planta daninha, maior é a dose do herbicida requerida para um controle eficiente (CHRISTOFFOLETI et. al., 2005).

De acordo com Christoffoleti et al. (2000), toda população em que os indivíduos demonstram uma base genética variável quanto à tolerância a uma medida de controle, irá com o tempo, mudar sua composição populacional como mecanismo de fuga para sobrevivência, diminuindo a sensibilidade a esta medida de controle. Isto é consequência do papel de seleção natural das espécies (DARWIN, 1981). Portanto, com a chegada do plantio direto, que no início obteve uma redução bastante acentuada da incidência de plantas daninhas, porém, mais tarde, houve uma seleção de espécies que se adaptaram a germinação

na nova condição, tanto que atualmente o seu controle é de tal maneira necessário quanto no sistema convencional (CHRISTOFFOLETI et al., 2000).

Cada vez mais, o número de espécies de plantas daninhas resistentes ao glyphosate vem aumentando, sendo que hoje em dia são reconhecidas trinta e duas espécies resistentes distribuídas em diversas diferentes regiões do mundo (WEED SCIENCE, 2015). O primeiro caso de resistência de azevém (*Lolium perene ssp. multiflorum*) ao herbicida glyphosate foi relatado em pomares no Chile por Perez e Kogan (2003), onde, em média, foram realizadas três aplicações por ciclo, durante os últimos 10 anos. Já na Austrália, depois de 15 anos de uso bem sucedido de glyphosate, foram identificados biótipos de *L. rigidum* resistentes a esse herbicida (OWEN e POWLES, 2010). Recentemente, na Austrália foram identificadas mais de 95% de 362 populações amostradas de *L. rigidum*, resistência aos inibidores da ALS (OWEN et al., 2014).

No Brasil, Roman et al. (2004) identificaram biótipos de azevém (*L. multiflorum*) resistentes ao glyphosate em lavouras de culturas anuais e em pomares de maçã no Rio Grande do Sul. Em todos esses casos a aplicação repetida e continuada de glyphosate para controle da vegetação é considerada a principal causa da seleção dos biótipos resistentes.

Além de azevém, também está registrado no Brasil biótipos de *Digitaria insularis*, *Conyza canadensis*, *C. sumatrensis*, *C. bonariensis* e *Chloris elata* resistentes ao glyphosate (ROMAN et al., 2004; VARGAS et al., 2004; HEAP, 2014; SANTOS et al., 2014; HRAC, 2015). Desta forma, o uso do glyphosate fica cada vez mais limitado devido ao aumento de casos de resistência de espécies invasoras a este herbicida, onde muitas vezes há um aumento de custo e ainda não garantindo a mesma eficiência.

O mecanismo que confere resistência ao glyphosate ainda não foi determinado com clareza, mas Vargas et al. (2007) trabalhando com biótipo de *L. multiflorum* proveniente do Rio Grande do Sul observaram que o gene de resistência apresenta dominância incompleta, ou seja, semidominante. Entretanto, Ribeiro et al. (2008) sugerem que a resistência do azevém ao glyphosate não seja totalmente atribuída a um único mecanismo. Lorraine-Colwill et al. (2001), encontraram diferenças na translocação do glyphosate entre os biótipos resistentes e sensíveis de *L. rigidum*. Já Ferreira et al. (2006) observaram que o biótipo suscetível e o resistente de *L. multiflorum* absorvem glyphosate na mesma intensidade, mas o mecanismo de resistência está relacionado com a menor translocação desse herbicida nos biótipos resistentes.

Portanto, o controle dos biótipos de azevém resistentes ao glyphosate evidencia-se como um grande problema devido ao reduzido número de produtos registrados,

principalmente para a fruticultura (FERREIRA et al., 2008). De forma contrária, para as culturas anuais, existe um número maior de moléculas disponíveis e igualmente eficientes para o controle de azevém, mas com custos superiores ao glyphosate (SEAB, 2015).

3.2. Definição da resistência de plantas daninhas a herbicidas

Existe muita divergência na literatura sobre resistência de plantas daninhas aos herbicidas, quanto ao uso dos termos "resistência" e "tolerância". Frequentemente estes termos são usados sem critério por algumas pessoas. Segundo a Weed Science Society of America (WSSA), a resistência de plantas daninhas a herbicidas pode ser definida como “a habilidade de uma planta sobreviver e reproduzir, após exposição a uma dose de herbicida normalmente letal para o biótipo selvagem da planta” (WEED SCIENCE, 2015). Está implícito nesta definição que a característica de resistência a herbicidas de uma planta pode ser um evento natural ou induzida por artifícios de engenharia genética, seleção de determinadas culturas de tecidos ou mutagênese (HEAP, 2014).

Christoffoleti e López-Ovejero (2003) definiram a resistência de plantas daninhas a herbicidas como a capacidade natural e herdável de alguns biótipos, dentro de uma determinada população de plantas daninhas, de sobreviver e se reproduzir após a exposição à dose de um herbicida, que seria letal a uma população normal (suscetível) da mesma espécie.

Biótipo é um grupo de indivíduos com genética semelhante, pouco diferenciado da maioria dos indivíduos da população (KISSMANN, 1996).

3.3. Resistências de plantas daninhas ao glyphosate: situação Brasil e Mundo

A evolução da resistência de plantas daninhas a herbicidas é um processo dinâmico e seu impacto depende de diversos fatores, tais como genéticos, biológicos, herbicidas e operacionais (POWLES e YU, 2010). Nesse sentido, o surgimento de plantas daninhas resistentes aos herbicidas pode ser considerado recente, apesar dos herbicidas serem utilizados há mais de 55 anos (CHRISTOFFOLETI et al., 1994).

A resistência de plantas daninhas aos herbicidas foi demonstrada pela primeira vez no final da década de 60, e a partir daí o número de casos catalogados no site do HRAC (Herbicide Action Committee) tem aumentado rapidamente nos últimos anos (HRAC, 2015). Recentemente, foi relatada a ocorrência de *Amaranthus palmeri* resistente ao glyphosate no Brasil em áreas agrícolas no Estado de Mato Grosso. Essa espécie é exótica e esse é o primeiro relato de sua ocorrência no Brasil. *A. palmeri* (família Amaranthaceae) é um tipo de caruru originário de regiões áridas do centro sul dos Estados Unidos e norte do México,

presente em vários países do mundo. Nos últimos anos, se tornou a principal planta daninha do algodoeiro nos Estados Unidos, em função de suas características biológicas e da resistência a herbicidas de diferentes mecanismos de ação (ANDRADE Jr et al., 2015).

Na Tabela 1 encontram-se os relatos de casos de identificação da resistência ao herbicida glyphosate (inibidor da enzima EPSPs) no mundo até março de 2015, sendo caracterizadas como destaque, seis espécies até o referido período no Brasil.

Tabela 1. Espécies de plantas daninhas resistentes ao glyphosate identificadas no mundo.

	Espécie	País	Ano
1	<i>Lolium rigidum</i>	Austrália; Estados Unidos; África do Sul; França; Espanha; Israel; Itália	1996
2	<i>Eleusine indica</i>	Malásia; Colômbia; Bolívia; China; Costa Rica; Estados Unidos; Argentina; Japão	1997
3	<i>Conyza canadensis</i>	Estados Unidos; Brasil; China; Espanha; República Tcheca; Canadá; Polônia; Itália; Portugal; Grécia; Japão	2000
4	<i>Lolium perenne ssp. multiflorum</i>	Chile; Brasil; Estados Unidos; Espanha; Argentina; Itália; Japão; Nova Zelândia	2001
5	<i>Conyza bonariensis</i>	África do Sul; Espanha; Brasil; Israel; Colômbia; Estados Unidos; Austrália; Grécia; Portugal	2003
6	<i>Plantago lanceolata</i>	África do Sul	2003
7	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Estados Unidos*; Canadá	2004
8	<i>Ambrosia trifida</i>	Estados Unidos; Canadá	2004
9	<i>Parthenium hysterophorus</i>	Colômbia	2004
10	<i>Amaranthus palmeri</i>	Estados Unidos	2005
11	<i>Amaranthus</i>	Estados Unidos	2005
12	<i>Digitaria insularis</i>	Paraguai; Brasil	2005
13	<i>Hedyotis verticillata</i>	Malásia	2005
14	<i>Sorghum halepense</i>	Argentina; Estados Unidos	2005
15	<i>Echinochloa colona</i>	Austrália; Estados Unidos; Venezuela; Argentina	2007
16	<i>Kochia scoparia</i>	Estados Unidos; Canadá	2007
17	<i>Cynodon hirsutus</i>	Argentina	2008
18	<i>Lolium perenne</i>	Argentina; Nova Zelândia; Portugal	2008
19	<i>Urochloa panicoides</i>	Austrália	2008
20	<i>Conyza sumatrensis</i>	Espanha; Brasil; França; Grécia	2009
21	<i>Chloris truncata</i>	Austrália	2010
22	<i>Leptochloa virgata</i>	México	2010
23	<i>Poa annua</i>	Estados Unidos	2010
24	<i>Raphanus raphanistrum</i>	Austrália	2010
25	<i>Bromus diandrus</i>	Austrália	2011
26	<i>Amaranthus spinosus</i>	Estados Unidos	2012
27	<i>Amaranthus hybridus</i>	Argentina	2013
28	<i>Bidens pilosa</i>	México	2014
29	<i>Brachiaria eruciformis</i>	Austrália	2014
30	<i>Bromus rubens</i>	Austrália	2014
31	<i>Chloris elata</i>	Brasil	2014
32	<i>Sonchus oleraceus</i>	Austrália	2014

Fonte: Adaptado de Weed Science, 2015. *O primeiro país corresponde onde foi detectado o primeiro caso de resistência da referida espécie.

3.4. Diversidade genética e resistência a herbicidas para plantas daninhas

Uma característica intrínseca às plantas daninhas é a grande diversidade genética (VIDAL e MEROTO, 2001). De acordo com Winkler et al. (2002), essa diversidade genética presente em uma população é decorrência do processo de evolução natural da espécie, que resulta principalmente da variação mendeliana, da hibridação interespecífica e da poliploidia. Para Vargas et al. (1999) a elevada diversidade genética em uma população de plantas daninhas pode predispor-la à elevada frequência inicial do alelo de resistência, sendo este um dos principais fatores que colaboram para a rápida seleção de biótipos resistentes aos herbicidas. Portanto, os genes que conferem resistência a um determinado herbicida podem estar presentes nas plantas antes mesmo dele ter sido utilizado na área.

Com o avanço na biologia molecular, estudos sobre a variabilidade genética em plantas daninhas com o uso de marcadores moleculares têm sido amplamente realizados para diversas espécies. Essas técnicas moleculares permitem estimar a variabilidade genética dentro e entre espécies, bem como servem de ponto de partida para trabalhos de manejo das plantas daninhas, pois, comparadas ao sequenciamento permitem encontrar genes de resistência, assim como possíveis mutações relacionadas ao aparecimento de indivíduos resistentes em determinadas espécies (VIDAL et al., 2005).

Vidal et al. (2005, 2006) utilizaram o marcador RAPD para avaliar a variabilidade genética de acessos de *Bidens* spp., oriundos de uma única propriedade, verificaram grande variabilidade genética dentro da população. Para Lamego et al. (2006), essa técnica de marcador molecular se mostrou eficiente ao determinarem o grau de similaridade genética entre acessos de picão-preto suscetíveis e resistentes aos herbicidas inibidores da ALS equivalente a 37%. Essa baixa similaridade ou grande variabilidade existente entre as plantas permitiu evidenciar que a resistência aos herbicidas na região estudada se configurou pela seleção de indivíduos resistentes preexistentes na população.

Vieira (2003), analisando a variabilidade genética em acessos de trapoeraba (*Commelina benghalensis*) em comparação à resposta fenotípica ao herbicida glyphosate, através da análise de dados do marcador RAPD, encontrou uma considerável variabilidade genética entre os acessos estudados e este não permitiu agrupar, distintamente, os acessos tolerantes e sensíveis ao glyphosate. Winkler et al. (2003), estudando a diversidade genética de populações da espécie leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) resistentes a herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), detectaram por marcador RAPD o coeficiente médio de similaridade de 40%, constatando-se então variabilidade genética entre as populações.

3.5. Estratégias de manejo da resistência a herbicidas: misturas em tanque.

Sem um controle eficiente, as plantas daninhas podem reduzir a produtividade das culturas agrícolas. Muitas vezes, em nível de campo, ocorrem várias plantas daninhas numa mesma área, onde muitas vezes, os herbicidas não têm espectro de ação capaz de controlar o conjunto de problemas, tornando-se necessário o uso de misturas em tanque de agrotóxicos. Essa prática é comum não só no Brasil, como em outros países (OLIVEIRA, 2014).

Em nível mundial, no campo agropecuário, as perdas de produtividade ocasionadas pelas plantas daninhas estão na ordem de 33%, contra 26,3% para doenças de plantas cultivadas; 16,7% para doenças de animais; 13,6% para erosão dos solos e 9,6% para ataques de insetos a plantas cultivadas (PELISSARI et al., 2011). Segundo os autores, frequentemente não há preocupação com estas perdas, por não serem diretamente detectadas pelo produtor, o qual somente entenderá o real prejuízo somente no momento da colheita. Entretanto, essa preocupação se torna evidente quando aparecem biótipos de plantas daninhas resistentes, o que torna o seu controle, na maioria das vezes, difícil e mais oneroso.

Em se tratando de plantas daninhas resistentes, as misturas em tanque de herbicidas representam importante ferramenta. Nas áreas cultivadas com grãos, as aplicações no manejo das plantas daninhas na entressafra costumam ser feitas com pelo menos dois herbicidas, simultaneamente. A combinação de produtos de diferentes mecanismos de ação pode solucionar os problemas com as espécies resistentes ao glyphosate, como *Conyza* spp., *D. insularis* e *L. multiflorum*, em campo (VARGAS et al., 2013), onde para prevenir a expansão de espécies de plantas daninhas resistentes, em áreas intensivamente tratadas com herbicidas, como é o caso das áreas cultivadas por soja transgênica tolerante ao glyphosate, se recomenda a rotação de culturas e a mistura de herbicida de diferentes mecanismos de ação (KRUSE et al., 2000). As misturas podem ser sinérgicas ou antagônicas, e respectivamente, promover aumento ou redução do controle da planta alvo. Além disso, quando o controle das plantas daninhas pela mistura é equivalente ao controle esperado, a resposta é considerada aditiva (LICH et al., 1997).

Efeitos de sinergismo podem ser exemplificados como os observados em associações de glyphosate e imazethapyr (STARKE e OLIVER, 1998). Entretanto, Shaw e Arnold (2002) relataram antagonismo em associações de glyphosate com chlorimuron-ethyl, cloransulam-methyl, fomesafen, imazaquin ou pyriithiobac no controle de *Ipomoea lacunosa* L.

Mariano e Ostrowski (2007) destacam a importância de conhecer qual a sequência na adição dos produtos quando se faz a mistura em tanque ou a pré-mistura, como uma forma de evitar incompatibilidades.

Gazziero (2015), em pesquisa com um questionário respondido por pessoas de 17 estados do Brasil, constatou que 97% dos entrevistados utilizam misturas em tanque, sendo 95% das vezes variando de dois a cinco produtos. Esse autor conclui ainda que, a forma como os agrotóxicos estão sendo misturados atualmente pode representar vantagens e desvantagens nas pulverizações agrícolas onde, as informações sobre misturas em tanque são insuficientes ou desconhecidas e faltam pesquisas e regulamentação. Assim, pode-se afirmar que se trata de um assunto para ser discutido com urgência com os órgãos governamentais competentes.

3.5.1. Herbicidas alternativos para o manejo do azevém resistente ao glyphosate.

O conhecimento das características da planta de azevém resistente ao herbicida glyphosate é de fundamental importância para que técnicas de manejo sejam utilizadas, visando evitar ou retardar seu aparecimento numa área. Alterações nas práticas de manejo são imprescindíveis quando uma população de plantas daninhas é selecionada em determinada área, em que o biótipo resistente começa a limitar a produção das culturas agrícolas. Do mesmo modo, o estudo de alternativas de controle é fundamental para o adequado manejo dos biótipos resistentes (LÓPEZ-OVEJERO et al., 2004; 2006).

Dentre os grupos de gramínicidas existentes no Brasil, existem os pertencentes ao mecanismo de ação dos inibidores da enzima ACCase (acetil CoA carboxilase), que por consequência inibem a síntese de lipídios. Esse grupo de herbicida é capaz de controlar plantas monocotiledôneas anuais ou perenes, sendo seletivos para culturas dicotiledôneas. Atualmente são considerados como alternativa de controle de plantas daninhas gramíneas, tal como o azevém, resistentes ou não ao glyphosate (VARGAS et al., 2005; RODRIGUES e ALMEIDA, 2011). O uso mais comum desses herbicidas é em aplicações sequenciais, para complementar a ação do glyphosate, ou associado ao glyphosate. Além disso, a possibilidade de rotação de mecanismos de ação é uma importante estratégia para a correta gestão de culturas, evitando a resistência (GEMELLI et al., 2013).

A hipótese inicial de resistência geralmente está baseada ao baixo controle de plantas daninhas a uma aplicação de herbicida. Muitas vezes, uma falha de controle pelo herbicida não significa, na maioria dos casos, que o agricultor está com problemas de plantas daninhas resistentes. Logo, a resistência pode ser considerada a causa possível quando todos os outros fatores de ineficácia de um herbicida tiverem sido analisados. Por isso, é importante realizar uma observação cuidadosa de alguns fatores a campo, para que qualquer redução na eficiência do herbicida possa ser detectada, tais como: aplicação do herbicida (dose ou momento inadequado, falhas de pulverização, tecnologia de aplicação adotada) e condições climáticas

(regime de chuvas e temperatura). Portanto, é imprescindível mudar frequentemente as práticas normalmente utilizadas no controle de plantas daninhas, para evitar ou adiar o surgimento de plantas daninhas resistentes (LÓPEZ-OVEJERO e CHRISTOFFOLETI, 2004).

Marochi et al. (2004), estudando alternativas de controle de azevém resistente ao herbicida glyphosate com aplicação do graminicida clethodim sobre cobertura de ervilhaca, observaram que o controle inicial através do herbicida clethodim, com a complementação dos efeitos da cobertura de ervilhaca sobre a emergência de novas plântulas de azevém, apresentou-se como uma excelente alternativa de manejo de biótipos de azevém resistente.

3.5.2. Uso de adjuvantes na qualidade da aplicação de dessecação.

Falhas na dessecação de plantas de azevém é uma grande preocupação nos campos de cultivos, pois a ressemeadura pode infestar os cultivos sucessivos (DOMINGOS et al., 2000).

A tecnologia de aplicação continua sendo o ponto de estrangulamento para melhor eficácia e retorno econômico. Os problemas iniciam-se com a qualidade da água, a sequência da mistura e segue com a diluição dos produtos no tanque e a deposição efetiva no alvo desejado (AZEVEDO 2011). Boller (2007) menciona que a aplicação de agrotóxicos é uma atividade complexa e somente apresenta bons resultados quando segue aspectos técnicos corretos e adequados. Entre esses aspectos técnicos relacionados à aplicação e que podem ser alterados, de acordo com a necessidade da operação, encontra-se os adjuvantes.

Adjuvante é qualquer substância presente na formulação do herbicida, ou adicionado ao tanque do pulverizador, que melhore a atividade herbicida ou as características físico-químicas da aplicação (MATTHEUS, 2004; VARGAS e ROMAN, 2006). Segundo Green e Hazen (1998), entre algumas das propriedades que influenciam na atividade biológica dos produtos fitossanitários estão a capacidade de molhamento, a tensão superficial, o balanço hidrofílico-lipofílico (BHL), a concentração micelar crítica, o pH, a estrutura química, a solubilização, o depósito, a foto-proteção, os íons trocáveis, a dose e a fitotoxicidade. É importante considerar que para boa parte dos herbicidas é difícil se obter bons resultados sem o acréscimo de algum tipo de adjuvante, assim como que este funcione bem em todas as circunstâncias (THEISEN e RUEDELL, 2004). Portanto, o sucesso da aplicação vai depender da escolha do produto certo com o adjuvante certo (GREEN, 2001).

Mendonça et al. (2007) relataram que uma das principais decorrências ocasionada pela adição de adjuvantes à calda de pulverização além da eficiência na ação dos herbicidas, é a redução na perda na forma de deriva. Segundo os autores, os adjuvantes podem aumentar a deposição das gotas nas plantas daninhas e a molhabilidade da superfície foliar, devido a

redução da tensão superficial e do ângulo de contato da gota, o que conseqüentemente, aumenta a penetração cuticular e a absorção do ingrediente ativo pela planta. Desta forma, o aumento na deposição de gotas e da absorção pode proporcionar melhores níveis de controle das plantas daninhas e contribui para a redução da dose do herbicida (MACIEL et al., 2010).

Maciel et al. (2011) constataram que os adjuvantes Agral[®], Silwet[®], Nimbus[®] Naturl'Oleo[®] e Ag Bem[®] elevaram significativamente o controle das espécies gramíneas *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria humidicola*, *Setaria geniculata* e *Sorghum bicolor*, quando associado aos herbicidas de ação de contato, paraquat e MSMA.

4. REFERÊNCIAS

ANDRADE Jr, E.R.; CAVENAGHI, A. L.; GUIMARÃES, S.C.; CARVALHO, S.J.P. Primeiro relato de *Amaranthus palmeri* no Brasil em áreas agrícolas no estado de Mato Grosso. Disponível em: <http://www.hrac-br.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2015/06/CircularTecnica19 IMAmt.pdf>. Acesso em: 17/06/2015.

AZEVEDO, L.A.S. Tecnologia e qualidade de aplicação de adjuvantes. In: **Adjuvantes agrícolas para a proteção de plantas**. Rio de Janeiro: IMOS Gráfica e Editora, 2011. p.199-234.

BOLLER, W. **Resposta da tecnologia de aplicação de defensivos agrícolas em relação à concepção atmosférica visando o controle de doenças de plantas**. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 30., Jaboticabal, 2007.p.113-117, 2007.

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

CHRISTOFFOLETI, P.J.; VICTORIA FILHO, R.; SILVA, C.B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, Viçosa, v.12, n.1, p.13-20, 1994.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; MEDEIROS, D.; MONQUEIRO, P.A.; PASSINI, T. **Plantas daninhas à cultura da soja: controle químico e resistência a herbicidas**. In: CÂMARA, G.M.S. (Ed.) Soja: tecnologia da produção. Piracicaba: ESALQ, 2000. p.179-202.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Definições e situação da resistência de plantas daninhas aos herbicidas no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P. J. (Coord.) **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Londrina: Associação Brasileira de Ação a resistência de Plantas aos Herbicidas (HRAC-BR), 2003. p. 2-21.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; TRENTIN, R.; TOCCHETTO, S.; MAROCHI, A.; GALLI, A.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; NICOLAI, M. Alternative herbicides to manage Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) resistant to glyphosate at different phenological stages. **Journal of Environmental Science and Health, Part B. Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v.40, n.1, p.59-67, 2005.

DARWIN, C. **A Origem das Espécies**. 5a ed. Tradução de Eduardo Fonseca. São Paulo: Hemus, 1981. 471p.

DOMINGOS, M.; SILVA, A.A.; SILVA, J.F. Qualidade da semente de feijão armazenada após dessecação química das plantas, em quatro estádios de aplicação. *Acta Scientiarum*, Maringá, v.22, n.4, p.1143-1148, 2000.

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

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**, Viçosa, v.24, n.2, p.365-370, 2006.

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

GAZZIERO, D.L.P. Misturas de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil. **Planta daninha**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 83-92, 2015.

GEMELLI, A.; OLIVEIRA JUNIOR, R.S.; CONSTANTIN, J; BRAZ, G.B.P.; JUMES, T.M. C.; GHENO, A.A.; RIOS, F.A.; FRANCHINI, L.H.M. Estratégias para o controle de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao glyphosate na cultura do milho safrinha. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Maringá, v.12, n.2, p.162-170, 2013.

GREEN, J.M.; HAZEN, J. Understanding and use adjuvants properties to enhance pesticide activity. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON ADJUVANTS FOR AGROCHEMICALS, 5., 1998, Tennessee. **Proceedings...** Memphis: ISAA, 1998.p.25-36.

GREEN, J.M. Factors that influence adjuvants performance. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON ADJUVANTS FOR AGROCHEMICALS, 5., 1998, Amsterdam. **Proceedings...** Washington: ISAA, 2001.p.179-190.

HEAP, I.A. **Criteria for confirmation of the herbicide-resistant weeds**. Disponível em: <http://www.weedscience.org/in.asp>. Acesso em: 25/06/2014.

HRAC-BR - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE AÇÃO A RESISTÊNCIA DE PLANTAS AOS HERBICIDAS. Disponível em: <http://www.hrac-br.com.br>. Acesso em: 03/2015.

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

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**: Tomo I. 2 ed. São Paulo: BASF, 1997. 825p.

- KRUSE, N.D.; TREZZI, M.M.; VIDAL, R.A. Herbicidas inibidores da EPSPs: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Maringá, v.2, n.1, p.139-146, 2000.
- LAMEGO, F.P.; RESENDE, L.V.; SILVA, P.R.; VIDAL, R.A.; NUNES, A.L. Distância genética e geográfica entre acessos de picão-preto suscetíveis e resistentes a herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.6, p.963-968, 2006.
- LICH, J.M.; RENNER K.A.; PENNER, D. Interaction of glyphosate with postemergence soybean (*Glycine max*) herbicides. **Weed Science**, Champaign, v.45, n.1, p.12-21, 1997.
- LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; VARGAS, L. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas**. In: VARGAS, L.; ROMAN, E. S. (Eds.). Manual de manejo e controle de plantas daninhas. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p. 185-214.
- LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; PENCKOWSKI, L.H.; PODOLAN, M.J.; CARVALHO, S.J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Alternativas de manejo químico da planta daninha *Digitaria ciliaris* resistente aos herbicidas inibidores da ACCase na cultura da soja. **Planta Daninha**, Viçosa, v.24, n.2, p.399-406, 2006.
- LORRAINE-COLWILL, D.F.; POWLES, S.B.; HAWKES, T.R.; PRESTON, C. Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Lolium rigidum* (Gaud.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.102, n.4, p.545-550, 2001.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. p.521.
- MATTHEWS, G.A. How was the pesticide applied? **Crop Protection**, v.23, n.7, p.651-653, 2004.
- MACIEL, C.D.G.; GUERRA, N.; OLIVEIRA NETO, A.M.; POLETINE, J.P.; BASTOS, S.L.W.; DIAS, N.M.S. Tensão superficial estática de misturas em tanque de glyphosate e + chlorimuron-ethyl isoladas ou associadas com adjuvantes. **Planta Daninha**, Viçosa, v.28, n.3, p.673-685, 2010.
- MACIEL, C.D.G.; MORAES, D.W.; BALAN, M.G. Eficiência de paraquat e MSMA isolados e associados a adjuvantes no manejo de plantas daninhas. **Global Science and Technology**, Goiania, v.04, n.01, p.70- 81, 2011.
- MARIANO, J.; OSTROWISKI, A. C. **Adição de produtos fitossanitários à calda de pulverização**. Coamo, 2007.
- MAROCHI, A.I.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; TRENTIN, R.; GALLI, A.J.B.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Sistemas de manejo para o controle de biótipos resistentes de azevém através de rotação com cobertura verde de ervilhaca (*Vicia sativa*) e herbicidas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 24. São Pedro, 2004. **Resumos...** São Pedro: SBCPD, 2004. p.269.

MENDONÇA, C.G.; RAETANO, C.G.; MENDONÇA, C.G. Tensão superficial estática de soluções aquosas com óleos minerais e vegetais utilizados na agricultura. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v.27, n.esp., p.16-23, 2007.

NELSON, L.R.; PHILLIPS, T.D.; WATSON, C.E. Plant breeding for improved production in annual ryegrass. In: ROUQUETTE Jr., F.M.; NELSON, L.R. (Ed.). **Ecology, production, and management of *Lolium* for forage in the USA**. Madison: CSSA, 1997. p.1-14.

NORO, G.; SCHEFFER-BASSO, S.M.; FONTANELI, R.S.; ANDREATTA, E. Gramíneas anuais de inverno para produção de forragem: avaliação preliminar de cultivares. **Agrociência**, Montevideo, v. 7, n. 1, p. 35-40, 2003.

OLIVEIRA, T. Mistura em tanque, aspectos legais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 29., 2014, Gramado. **Palestra...**Gramado: 2014. CD ROM.

OWEN, M.J.; POWLES, S.B. Glyphosate-Resistant Rigid Ryegrass (*Lolium rigidum*) populations in the Western Australian Grain Belt. **Weed Technology**, Champaign, v.24, n.1, p.44-49, 2010.

OWEN, M.J.; MARTINEZ, N.J.; POWLES, S.B. Multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* (annual ryegrass) now dominates across the Western Australian grain belt. **Weed Research**, Oxford, v.54, n.3, p.314-324, 2014.

PELISSARI, A.; MENDONÇA, C.G.; LANG, C.R.; BALBINOT JUNIOR, A.A. Avanços no controle de plantas daninhas no sistema de integração lavoura-pecuária. **Synergismus scyentifica**, Pato Branco, v.6, n.2, p.1-16, 2011.

PEREZ, A.; KOGAN, M. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. **Weed Research**, Oxford, v.43, n.1, p. 12-19, 2003.

POWLES, S.B.; YU, Q. Evolution in Action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.61, n.1, p.317-347, 2010.

RIBEIRO, D.N.; GIL, D.; CRUZ-HIPOLITO, H.E.; RUIZ-SANTAELLA, J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; VIDAL, R.A.; PRADO, R.A. Rapid assays for detection of glyphosate-resistant *Lolium* spp. **Journal of Plant Diseases Protecion**, Stuttgart, v.21, n.1, p.95-99, 2008.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. 6.ed. Londrina: IAPAR, 2011. 697p.

ROMAN, E.S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M.A.; MATTEI, R.W. Resistência de Azevém (*Lolium multiflorum*) ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v.22, n.2, p.301-306, 2004.

SANTOS, G.; OLIVEIRA JÚNIOR, R.S.; CONSTANTIN, J.; FRANCISCHINI, A.C.; OSIPE, J. B. Multiple resistance of *Conyza sumatrensis* to chlorimuron-ethyl and to glifosato. **Planta Daninha**, Viçosa, v.32, n.2, p.409-416, 2014.

SEAB - Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná. **Agrotóxicos no Paraná**. Disponível em: <<http://celepar07web.pr.gov.br/agrotoxicos/pesquisar.asp>> Acesso em: 21/04/2015.

STARKE, R.J.; OLIVER, L.R. Interaction of glyphosate with chlorimuron, fomesafen, imazetaphyr, and sulfentrazone. **Weed Science**, Champaign, v.46, n.6, p.652-660, 1998.

SHAW, D.R.; ARNOLD, J.C. Weed control from herbicide combinations with glyphosate. **Weed Technology**, Champaign, v.16, n.1, p.1-6, 2002.

THEISEN, G.; RUEDELL, J. **Tecnologia de Aplicação de Herbicidas**. Teoria e Prática 1ª ed. Cruz Alta: Aldeia Norte, 2004. 90p.

VARGAS, L.; SILVA, A.A.; BORÉM, A.; REZENDE, S.T.; FERREIRA, F.A.; SEDIYAMA, T. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Viçosa, MG: Jard Produções Gráficas Ltda, 1999. 131 p.

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**, Viçosa, v.22, n.4, p.617-622, 2004.

VARGAS, L.; ROMAN, E.S.; RIZZARDI, M.A.; SILVA, V.C. Alteração das características biológicas dos biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) ocasionada pela resistência ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v.23, n.1, p.153-160, 2005.

VARGAS, L.; ROMAN, E.S. **Conceitos e aplicações dos adjuvantes**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 10 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 56). Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do56.htm. Acesso em: 21/04/2014.

VARGAS, L.; MORAES, R.M.A.; BERTO, C.M. Herança da resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao glyphosate. **Planta daninha**, Viçosa, v.25, n.3, p.567-571, 2007.

VARGAS, L. et al. Histórico, custo e o desafio do manejo no futuro. In: RESTAINO, E. **Viabilidad del glyphosate em sistemas productivos sustentables**. Estanzuela en Colonia: INIA, 2013. p. 99-110. (Série Técnica, 204)

VIDAL, R.A.; MEROTTO JÚNIOR, A. **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 2001. 152p.

VIDAL, R.A.; LAMEGO, F.P.; RESENDE, L.V.; SILVA, P.R.; DELATORRE, C.A.; TREZZI, M.M. Similaridade genética entre acessos de *Bidens pilosa* resistentes aos herbicidas inibidores da ALS. **Planta Daninha**, Viçosa, v.23, n.3, p.551-556, 2005.

VIDAL, R.A.; HERNANDES, G.C.; WINKLER, L.M.; FEDERIZZI, L.C.; SILVA, P.R. Relação entre distância geográfica e variabilidade genética de uma população de *Bidens* spp. com resistência aos herbicidas inibidores de ALS. **Planta Daninha**, Viçosa, v.24, n.1, p.149-155, 2006.

VIEIRA, V.C. **Variabilidade genética em acessos de trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.) e suas respostas ao glyphosate**. 2003. 52f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

WEED SCIENCE. **International survey of herbicide resistant weeds**. Disponível em: <http://www.weedscience.org/in.asp>. Acesso em 25/03/2015.

WINKLER, L.M.; VIDAL, R.A.; BARBOSA NETO, J. F. Aspectos genéticos envolvidos na resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Plantio Direto**, Passo Fundo, v.70, n.4, p.21-24, 2002.

WINKLER, L.M.; VIDAL, R.A.; BARBOSA NETO, J.F. Caracterização genética de *Euphorbia heterophylla* resistente a herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.9, p.1067-1072, 2003.

5. CAPÍTULO I

RAMOS, Darwin Caleff. **Avaliação da ocorrência de biótipos de azevém com suspeita de resistência ao glyphosate na região de Guarapuava-PR.** 2015. 62f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Estadual do Centro Oeste, Unicentro, Guarapuava-PR.

RESUMO. O trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de biótipos de azevém (*Lolium perene* ssp. multiflorum) com suspeita de resistência ao glyphosate na região de Guarapuava-PR, assim como analisar se existe um comportamento similar entre os biótipos quando submetidos ao controle químico. Para os experimentos a campo utilizou-se esquema fatorial 5x3+1, constituído por cinco herbicidas (glyphosate 4320 g ha⁻¹; iodosulfurom-methyl 7,5 g ha⁻¹; clethodim 192 g ha⁻¹; quizalofop-p-tefuril 240 g ha⁻¹ e paraquat 600 g ha⁻¹), três localidades (Unicentro, Entre Rios e Palmeirinha) e uma testemunha. Para os experimentos em vaso foi utilizado esquema fatorial 3x2+1, constituídos por três tratamentos herbicidas (glyphosate com 2160 e 4320 g ha⁻¹, iodosulfurom-methyl 12,5 e 25,0 g ha⁻¹, clethodim 192 e 384 g ha⁻¹), conduzidos com 60 e 45 repetições em casa de vegetação e em ambiente natural, respectivamente, e uma testemunha sem aplicação. Das três localidades estudadas com suspeita da presença de azevém resistente ao glyphosate, apenas uma foi caracterizada com a presença de biótipos resistentes (Unicentro, Campus CEDETEG). Assim, a resistência do azevém ao glyphosate relatada pelos agricultores da região de Guarapuava/PR pode estar sendo motivada por outros fatores, como o uso de doses inadequadas e da qualidade da tecnologia de aplicação empregada. Os herbicidas paraquat, clethodim e quizalofop-p-tefuril foram excelentes alternativas de rotação de mecanismo de ação para infestações de azevém resistente e/ou com suspeita de resistência ao glyphosate, na região de Guarapuava-PR.

Palavras-chave: *Lolium perene* ssp. multiflorum, herbicida, resistência, manejo.

RAMOS, Darwin Caleff. **Occurrence evaluation of Italian ryegrass biotypes with resistance suspect to glyphosate in Guarapuava County, Parana State.** 2015. 62f. Dissertation (Master in Plant Production), UNICENTRO.

ABSTRACT. The work aimed to evaluate the occurrence of Italian ryegrass (*Lolium perene* ssp. *multiflorum*) biotypes with resistance suspect to to glyphosate in Guarapuava County, Paraná State, as well as analyze whether there is a similar behavior when subjected to chemical control. For the experiments the field we used factorial scheme 5x3+1, consisting of five herbicides (glyphosate 4320 g ha⁻¹; iodosulfurom-methyl 7.5 g ha⁻¹; clethodim 192 g ha⁻¹; quizalofop-p-tefuril 240 g ha⁻¹ and paraquat 600 g ha⁻¹), three localities (Unicentro, Entre Rios and Palmeirinha) and a check. The other was used 3x2+1 factorial scheme, consisting of three herbicides treatments (glyphosate with 2160 and 4320 g ha⁻¹; iodosulfurom-methyl and 12.5 and 25.0 g ha⁻¹; clethodim and 192 384 g ha⁻¹), conducted with 60 and 45 repetitions in greenhouse conditions and in natural environment, respectively, and a check without application. Of the three locations studied with suspicion of the presence of glyphosate resistant Italian ryegrass, only one was characterized by the presence of resistant biotypes (Unicentro). Thus, the resistance of Italian ryegrass to glyphosate reported by farmers of Guarapuava County, Paraná State, may be motivated by other factors, such as the use of inappropriate doses and quality of application technology employed. The herbicides paraquat clethodim and quizalofop-p-tefuril were excellent rotation alternatives of action mechanism for infestations of resistant Italian ryegrass and/or suspected glyphosate resistance, in the region of Guarapuava County, Paraná State.

Keywords: *Lolium perene* ssp. *multiflorum*, herbicide, resistance, management.

5.1. INTRODUÇÃO

O azevém (*Lolium perene ssp. multiflorum*) tem sua origem na Bacia do Mediterrâneo, e foi cultivado inicialmente ao Norte da Itália, sendo introduzido no Brasil provavelmente pelos imigrantes italianos (FLOSS, 1988). Em relação à sua distribuição, Flaresso e Almeida (1992) descreveram que o azevém anual é uma gramínea empregada como forrageira de inverno, em cultivo único ou consorciado, nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e nas regiões mais frias do Paraná, em função da sua boa produtividade de massa e qualidade da forragem. Portanto, é uma excelente forrageira de estação fria, bem como uma gramínea importante em sistemas de plantios que necessitam uma boa cobertura de solo, como o plantio direto.

O sistema plantio direto iniciado no Brasil na década de 1970 teve como finalidade reduzir as perdas de solo por erosão por meio do uso cobertura morta constituída por forrageiras, ou culturas e adubos verdes manejados para essa finalidade (PRAGANA et al., 2012). Segundo Floss (2005), é necessário na superfície do solo em torno 9 a 12 toneladas de palha por ano para sustentação do sistema de plantio direto. A palhada de azevém possui elevado potencial em suprimir a emergência e o crescimento das invasoras devido ao sombreamento (BALBINOT JR et al., 2005), além de diminuir a amplitude térmica do solo e aumentar a população de microrganismos que podem infectar diásporos de plantas daninhas (VIDAL E TREZZI, 2004), assim como dos teores de matéria orgânica (CALEGARI e COSTA, 1992).

De forma contrária, nas lavouras de soja, trigo e milho o azevém é considerado uma importante planta daninha, e o manejo antes da semeadura é geralmente realizado com o herbicida glyphosate (ROMAN et al., 2004). Segundo Galli (2009), o grande uso do glyphosate se dá pela alta eficiência no controle, facilidade de manuseio e baixo custo relativo. Devido a essas características, se tornou o principal herbicida para uso em vários ambientes agrícolas ao redor do mundo ao longo de mais de 35 anos (HARTZLER, 2014).

Pertencente ao grupo de herbicidas inibidores da 5-enol-piruvil-chiquimate- 3-fosfato sintase (EPSPs), sendo não seletivo e de ação sistêmica, o glyphosate inibe esta enzima na rota de síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais fenilalanina, tirosina e triptofano, que são precursores de outros produtos, como lignina, alcaloides, flavonoides e ácidos benzoicos. Os principais sintomas nas plantas sob seu efeito são amarelecimento dos meristemas e necrose (MOREIRA et al., 2010; RODRIGUES e ALMEIDA, 2011; RUAS et al., 2012).

Devido ao uso repetido de glyphosate nas mesmas áreas, várias vezes por ano, têm-se constatado em todo mundo, casos de resistência. *Lolium rigidum* foi o primeiro caso relatado de resistência de plantas daninhas ao glyphosate registrado na Austrália em 1996, sendo que dezenove anos depois foi relatada a resistência a esse herbicida em outros 31 biótipos em vários países (OWEN e POWLES, 2010). No Brasil, foram registrados até o momento, seis casos de plantas daninhas resistentes ao glyphosate, constituindo as espécies *Lolium perene ssp. multiflorum* (azevém), *Conyza canadensis* (buva), *Conyza bonariensis* (buva), *Conyza sumatrensis* (buva), *Digitaria insularis* (capim-amargoso) e *Chloris elata* (WEED SCIENCE, 2015). Além disso, existem também relatos de espécies tolerantes ao glyphosate, tais como a *Euphorbia heterophylla*, *Ipomoea* spp., *Commelina benghalensis* e *Richardia brasiliensis* (VARGAS e GAZZIERO, 2008).

O uso de herbicidas de baixa eficiência sobre azevém, mesmo com mecanismos de ação alternativos ao glyphosate, intensifica o processo de seleção de biótipos resistentes. Entretanto, os maiores problemas ainda estão relacionados ao uso individual do glyphosate. No Brasil, existem relatos desta espécie possuir biótipos resistentes aos herbicidas inibidores de EPSPs e ACCase, além de resistência múltipla, ou seja, resistência a ambos mecanismos de ação (HEAP, 2015). No Rio Grande do Sul, azevém resistente ao glyphosate constitui em um grave problema nas lavouras de soja transgênica, trigo e pomares, levando a um considerável aumento nos custos de produção (VARGAS et al., 2005).

Rockenbach et al. (2015), avaliando o controle de azevém observaram bons resultados com os herbicidas paraquat e amônio-glufosinato, assim como para as associações de glyphosate com clethodim ou quizalofop-p-tefuril, constituindo-se em opções viáveis para o controle desta espécie. Entretanto, Vargas et al. (2013), trabalhando com curvas de dose-resposta em biótipos de azevém resistente e suscetível ao clethodim, necessitou aumentar em 15,3 vezes a dose desse herbicida para proporcionar controle eficiente ao biótipo resistente.

Desta forma, o trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de biótipos de azevém (*Lolium perene ssp. multiflorum*) com suspeita de resistência ao glyphosate em áreas identificadas por agricultores e técnicos na região de Guarapuava-PR, assim como se existe um comportamento similar quando submetidos ao controle químico.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi dividido em duas etapas, sendo no conjunto consideradas como experimentos 1 e 2, em função das atividades e condições desenvolvidas.

ETAPA 1

Três experimentos foram conduzidos a campo, entre abril e julho de 2014, em diferentes localidades do município de Guarapuava-PR (Experimento 1), sendo estas caracterizadas pelos agricultores e/ou técnicos com suspeita da presença predominante de biótipos de azevém resistentes ao controle com o herbicida glyphosate. As localidades foram constituídas por um experimento na área agrícola do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO, *Campus* CEDETEG, nas coordenadas geográficas S 23° 12' 28,8" de latitude, W 53° 18' 14,7" de longitude e a 1.020 m de altitude; outro na propriedade do Sr. Helmut Henger, no Distrito de Entre Rios, nas coordenadas geográficas S 25° 31' 18" de latitude, W 51° 32' 48" de longitude e a 1.717 m de altitude; e um terceiro na Fazenda Santa Maria, no Distrito de Palmeirinha, nas coordenadas geográficas S 25° 19' 90,6" de latitude, W 51° 33' 91,1" de longitude e a 1029 m de altitude.

As três propriedades apresentam solo classificado como Latossolo Bruno distrófico típico (EMBRAPA, 2013). O clima da região é classificado como Cfb subtropical mesotérmico úmido (KÖPPEN, 1948), com verões frescos, invernos com ocorrência de geadas severas e frequentes, não apresentando estação seca. A temperatura média máxima anual é de 23,5°C e a temperatura média mínima anual é de 12,7°C (IAPAR, 2013). Na Figura 1, verificam-se os dados meteorológicos referentes ao período de execução do trabalho.

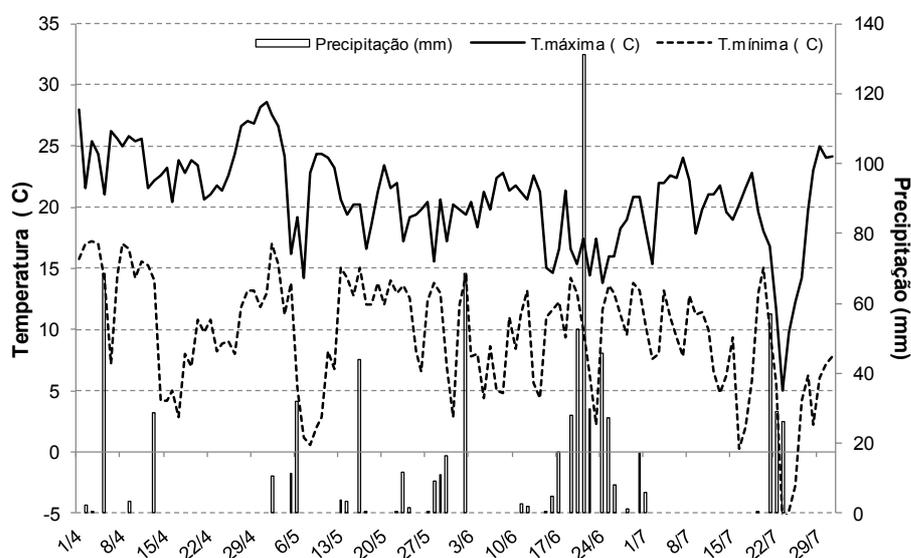


Figura 1. Dados meteorológicos referentes ao período de desenvolvimento das avaliações nas três localidades estudadas. Guarapuava, PR - 2013. (Experimentos 1 e 2).

O delineamento experimental utilizado foi representado por blocos casualizados com quatro repetições e dezesseis tratamentos em esquema fatorial 5 x 3 + 1, constituído por cinco herbicidas (glyphosate com 4320,0 g e.a. ha⁻¹, iodosulfuron-methyl 7,5 g i.a. ha⁻¹, clethodim

192 g i.a. ha⁻¹, quizalofop-p-tefuriil 240 g i.a. ha⁻¹ e paraquat 600 g i.a. ha⁻¹), três localidades (Unicentro *Campus* CEDETEG, Entre Rios e Palmeirinha) e uma testemunha sem aplicação. As unidades experimentais foram representadas por parcelas com dimensões de 4,0 x 6,0 m (24 m²), onde no momento das avaliações de controle foram desconsiderados 0,50 m das extremidades e uma linha lateral das parcelas.

As aplicações dos tratamentos foram realizados na modalidade de dessecação utilizando um pulverizador costal pressurizado a CO₂, equipado com barra de seis pontas TTI 110.015, espaçadas entre si em 0,5 m e a 0,5 m de altura das plantas, em velocidade de deslocamento de 3,6 km h⁻¹, o que constituiu taxa de aplicação de 200 L ha⁻¹. No momento das aplicações as plantas de azevém encontrava-se altamente perfilhadas, com touceiras de 10 a 20 perfilhos, em estágio fenológico de desenvolvimento vegetativo, não sendo ainda caracterizado emissão de inflorescências.

Na Tabela 1 encontram-se dispostos além dos tratamentos desenvolvidos a campo e as datas e condições meteorológicas no momento das aplicações (início e final), monitoradas por meio de anemômetro digital portátil.

Tabela 1. Disposição dos tratamentos, doses e respectivas condições meteorológicas no momento das aplicações para avaliação do manejo do azevém (*L. multiflorum*) na região de Guarapuava-PR. Guarapuava, PR - 2013. (Experimento 1).

Trat	Experimento 1			Condições meteorológicas na aplicação			
	Aplicação de Dessecação	Dose (L ou kg p.c. ha ⁻¹)	Dose (g e.a. ou i.a. ha ⁻¹)	Locais (data) (horário)	Unicentro (25/05/13) (15:20 a 15:55 hs)	Palmeirinha (05/06/13) (13:35 a 13:58 hs)	Entre Rios (08/06/13) (17:15 a 17:50 hs)
1	glyphosate ¹ + Assist ⁶	6,0 + 1,0	4320,0	Temp Inicial	19,2 °C	23,5 °C	20,2 °C
2	iodosulfuron ² + Aureo ⁷	0,15 + 1,0	7,5	Temp Final	17,5 °C	21,3 °C	19,4 °C
3	clethodim ³ + Assist ⁶	0,8 + 1,0	192,0	UR Inicial	67,6%	55,4%	60,5%
4	quizalofop ⁴ + Assist ⁶	2,0 + 1,0	240,0	UR Final	73,7%	56,9%	62,1%
5	paraquat ⁵ + Agral ⁸	3,0 + 0,5	600,0	Vento Inicial	1,8 km h ⁻¹	2,1 km h ⁻¹	1,3 km h ⁻¹
6	testemunha sem aplicação	-	-	Vento Final	2,5 km h ⁻¹	2,8 km h ⁻¹	1,7 km h ⁻¹

Obs. ¹ Roundup WG[®]; ² Hussar[®]; ³ Select 240 EC[®]; ⁴ Panther 120 EC[®] = quizalofop-p-tefuriil; ⁵ Gramoxone[®]; ⁶ Assist[®] = óleo mineral; Aureo^{®/7} = éster metílico de óleo de soja; ⁸ Agral[®] = nonil fenoxi poli (etilenoxi) etanol.

ETAPA 2

Em complemento aos experimentos de campo, um segundo experimento foi conduzido em casa de vegetação e ambiente natural na Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO, *Campus* CEDETEG, nas coordenadas geográficas S 23°12'28,8" de latitude, W 53°18'14,7" de longitude e a 1020 m de altitude. Nesta etapa (Experimento 2) foram coletadas cento e cinco (105) plantas de azevém caracterizadas como suspeita de resistência

ao glyphosate por não terem sido controladas pelo utilizando-se a dose de 4320 g e.a. ha⁻¹ nas localidades Unicentro e Palmeirinha.

De cada planta coletada foram retirados oito partes com 2 perfilhos, sendo destas 240 e 180 partes transplantadas em unidades experimentais representadas por recipientes plásticos com capacidade de 0,5 e 5,0 litros de solo, em casa de vegetação e ambiente natural, respectivamente. Portanto, essa etapa foi representada por dois experimentos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x2+1, constituídos por três tratamentos herbicidas (glyphosate 2160 e 4320 g e.a. ha⁻¹, iodosulfuron-methyl 12,5 e 25,0 g i.a. ha⁻¹, clethodim 192 e 384 g i.a. ha⁻¹), conduzidos com 60 e 45 repetições em casa de vegetação e em ambiente natural, respectivamente, e uma testemunha sem aplicação. A dose de 2.160 g ha⁻¹ de glyphosate (3 kg ha⁻¹ da formulação comercial) é aceita como sendo a dose-limite para determinar a sensibilidade de azevém ao glyphosate (Vargas et al., 2007). Roman et al. (2004) controlaram eficientemente o biótipo susceptível ao glyphosate com a dose de 360 g ha⁻¹.

As aplicações dos tratamentos herbicidas no Experimento 2 foram realizadas de forma semelhante a desenvolvida no Experimento 1. No momento das aplicações as plantas de azevém encontrava-se em estágio fenológico de 2 a 3 perfilhos e 5 a 7 perfilhos, respectivamente, para em condição de casa de vegetação e ambiente natural. Na Tabela 2 encontram-se dispostos os tratamentos e condições meteorológicas no momento das aplicações (início e final), monitoradas por meio de anemômetro digital portátil.

Tabela 2. Disposição dos tratamentos, doses e respectivas condições meteorológicas no momento das aplicações para avaliação do manejo do azevém (*L. multiflorum*) em condição de casa de vegetação e ambiente natural. Guarapuava, PR - 2013. (Experimento 2).

Trat	Experimento 2	Casa de Vegetação		Ambiente Natural		Condições Climatológicas	
	Aplicação	Dose (L ou kg p.c. ha ⁻¹)	Dose (g e.a. ou i.a. ha ⁻¹)	Dose (L ou kg p.c. ha ⁻¹)	Dose (g e.a. ou i.a. ha ⁻¹)	Dados médios (data) (horário)	(14/06/13) (15:35 a 15:55 hs)
1	glyphosate ¹ + Assist ⁴	3,0 + 1,0	2160,0	6,0 + 1,0	4320	Temperatura	21,2 °C
2	iodosulfuron ² + Aureo ⁵	0,25 + 1,0	12,5	0,5 + 1,0	25	Umidade Relativa	54,3%
3	clethodim ³ + Assist ⁴	0,8 + 1,0	192,0	1,6 + 1,0	384	Velocidade dos Ventos	0,8 km h ⁻¹
4	testemunha sem aplicação	-	-	-	-		

Obs. - ¹ Roundup WG[®]; ² Hussar[®]; ³ Select 240 EC[®]; ⁴ Assist[®] = óleo mineral (mistura de hidrocarbometos parafínicos, ciclo parafínicos e aromáticos saturados e insaturados); ⁵ Aureo[®] = Éster metílico de óleo de soja.

As características avaliadas foram a porcentagem de controle do azevém aos 7, 14, 21 e 35 dias após a aplicação (DAA) para o Experimento 1 e aos 15 e 30 DAA para o Experimento 2, por meio de escala de notas visuais (SBCPD, 1995), onde 0% correspondeu à ausência de injúrias e 100% à morte das plantas, assim como a matéria seca da parte aérea das plantas aos 35 DAA, apenas para o experimento 1.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as suas médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

ETAPA 1

Com relação a eficiência do glyphosate aplicado em diferentes localidades no município de Guarapuava-PR, com suspeita da presença de azevém resistente a esse herbicida, foram constatadas diferenças significativas na intensidade dos níveis de controle das localidades principalmente aos 7 e 14 DAA (Tabela 3). Até os 14 DAA, os maiores destaques em relação ao controle de azevém com o glyphosate (4320 g ha⁻¹) foram observados em Palmeirinha e Entre Rios, com 98,5% e 90,8% de eficiência, respectivamente, superando significativamente a localidade Unicentro (73,8%).

A partir dos 21 DAA, o controle de azevém com glyphosate foi altamente eficiente nas localidades de Palmeirinha e Entre Rios, as quais não diferindo significativamente do paraquat (600 g ha⁻¹). No entanto, os níveis de controle de azevém com glyphosate foram apenas satisfatório para a localidade Unicentro (*Campus* CEDETEG) até os 35 DAA (Tabela 3). Estes resultados indicam que os biótipos de azevém coletados na Unicentro apresentam maior tolerância ao glyphosate quando comparado aos biótipos coletados nas regiões de Palmeirinha e Entre Rios. Assim, a percepção/suspeita de resistência do azevém ao glyphosate relatada pelos agricultores nas referidas localidades estudadas pode estar sendo motivada em função de outros fatores, tais como o uso de doses inadequadas para a espécie e a qualidade da tecnologia de aplicação empregada. Outro aspecto, a ser considerado é sensibilidade diferencial dos genótipos de azevém diplóide e tetraplóide ao glyphosate. Dors (2009) observou que o azevém tetraplóide apresentou tolerância superior ao glyphosate de 1,6 vezes a dose para controlar o genótipo diplóide.

Para os herbicidas inibidores da enzima ACCase clethodim e quizalofop-p-tefuril, observou-se evolução dos níveis de eficiência entre 7 e 14 DAA (Tabela 3), com destaque somente para o clethodim utilizado em Palmeirinha, o qual teve eficiência satisfatória aos 14 DAA (82,5%), conforme os critérios da SBCPD (1995). Segundo Roman et al. (2007), os

sintomas nas plantas submetidas aos inibidores de ACCase demoram a aparecer em razão da lenta translocação e do mecanismo de ação nos meristemas.

Tabela 3. Controle (%) de azevém (*L. multiflorum*) aos 7, 14, 21 e 35 dias após a aplicação (DAA) em três localidades da região de Guarapuava-PR. Guarapuava, PR - 2013. (Experimento1).

Trat	Experimento 1		7 DAA			14 DAA		
	Aplicação de Dessecação	Dose (L ou kg p.c. ha ⁻¹)	Unicentro	Palmeirinha	Entre Rios	Unicentro	Palmeirinha	Entre Rios
1	glyphosate ¹ + Assist ⁶	6,0 + 1,0	38,3bC	63,8bA	57,5bB	73,8bC	98,5aA	90,8bB
2	iodosulfuron ² + Aureo ⁷	0,15 + 1,0	3,5cA	3,0cdA	3,5cA	14,0dA	10,8cAB	5,8eB
3	clethodim ³ + Assist ⁶	0,8 + 1,0	5,0cA	3,5cA	5,0cA	42,8cB	82,5bA	45,0cB
4	quizalofop ⁴ + Assist ⁶	2,0 + 1,0	3,0cA	3,0cdA	4,0cA	36,5cB	77,5bA	37,0dB
5	paraquat ⁵ + Agral ⁸	3,0 + 0,5	98,0aA	92,0aB	98,3aA	97,8aA	100,0aA	99,3aA
6	testemunha sem aplicação	-	0,0dA	0,0dA	0,0dA	0,0eA	0,0dA	0,0eA
F _{cal} (H)		-	6885,473*			1501,879*		
F _{cal} (L)		-	30,011*			170,221*		
F _{cal} (H x L)		-	49,916*			43,478*		
CV%		-	6,17			7,46		
DMS _(5%) (H)		-	3,45			7,04		
DMS _(5%) (L)		-	2,82			6,08		
Trat	Experimento 1		21 DAA			35 DAA		
1	glyphosate ¹ + Assist ⁶	6,0 + 1,0	83,3bB	99,0aA	95,8bA	86,0bB	99,5aA	99,3aA
2	iodosulfuron ² + Aureo ⁷	0,15 + 1,0	23,3cB	45,0cA	16,3dC	53,8cB	67,5bA	52,8bB
3	clethodim ³ + Assist ⁶	0,8 + 1,0	82,0bB	92,8abA	85,3cB	98,5aA	99,0aA	98,5aA
4	quizalofop ⁴ + Assist ⁶	2,0 + 1,0	80,8bB	89,8bA	78,3cB	99,0aA	98,5aA	98,8aA
5	paraquat ⁵ + Agral ⁸	3,0 + 0,5	98,5aA	100,0aA	99,8aA	99,0aA	100,0aA	100,0aA
6	testemunha sem aplicação	-	0,0dA	0,0dA	0,0eA	0,0dA	0,0cA	0,0cA
F _{cal} (H)		-	1319,651*			2780,198*		
F _{cal} (L)		-	45,034*			19,197*		
F _{cal} (H x L)		-	10,103*			10,916*		
CV%		-	5,99			3,51		
DMS _(5%) (H)		-	8,15			5,52		
DMS _(5%) (L)		-	6,64			1,32		

Obs. ¹ Roundup WG[®]; ² Hussar[®]; ³ Select 240 EC[®]; ⁴ Panther 120 EC[®] = quizalofop-p-tefuril; ⁵ Gramoxone[®]; ⁶ Assist[®] = óleo mineral; Aureo^{®/7} = éster metílico de óleo de soja; ⁸ Agral[®] = nonil fenoxi poli (etilenoxi) etanol.

- Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Aos 21 DAA foi identificado início do controle satisfatório de azevém para ambos herbicidas inibidores de ACCase, os quais aos 35 DAA já não mais diferiam entre si e entre as três localidades, constituindo excelentes níveis de eficiência, superiores a 98,5% (Tabela 3). Entretanto, é importante ressaltar que o uso frequente de herbicidas com mesmo mecanismo de ação pode favorecer o desenvolvimento de plantas daninhas resistentes (ROMAN et al., 2004; CHRISTOFFOLETI e LÓPEZ-OVEJERO, 2008). Na maioria das espécies de plantas

daninhas resistentes aos inibidores de ACCase tem sido atribuída por alterações no sítio de ação da enzima (VOLENBERG e STOLTENBERG, 2002). Segundo Devine (1997), a resistência a esse mecanismo de ação esta relacionada com diferentes mutações, sendo os graus de resistência variáveis dentro das espécies e linhagens, onde é comum ocorrer padrões diferenciados de resistência cruzada.

O iodosulfuron-methyl, na dose de 7,5 g ha⁻¹, não apresentou desempenho satisfatório no controle de azevém até os 35 DAA (Tabela 3), sendo que os níveis de eficiência obtidos nas três localidades não ultrapassaram 67,5%. Esse resultado além de caracterizar a ineficiência da dose comercial de iodosulfuron-methyl para o estágio de perfilhamento em que as plantas de azevém se encontravam, também indicou comportamento bastante singular entre as três localidades estudadas, onde se obteve controle superior na localidade de Palmeirinha em comparação às demais localidades.

Mariani et al. (2013), ao identificarem que a resistência do azevém ao iodosulfuron-methyl é codificada por gene dominante nuclear com dominância completa, também constataram baixa eficiência de controle para plântulas do biótipo suscetível até 28 DAA. Segundo Rodrigues & Almeida (2011) e Mariani et al. (2013), a eficácia do iodosulfuron-methyl para o controle de azevém dependente do estágio de desenvolvimento, sendo os melhores resultados obtidos em plantas jovens, com 2 a 4 folhas ou no máximo 1 perfilho.

De forma geral, os resultados de matéria seca da parte aérea das plantas de azevém, também indicam as mesmas tendências da avaliação visual de controle, sendo que os menores valores dessa variável constituíram os tratamentos mais eficientes (Tabela 4). Esses resultados corroboram com os descritos por Vargas et al. (2005) e Dors (2010), onde a fitomassa seca de azevém apresentou a mesma tendência dos resultados de porcentagem de controle, constituindo uma correlação inversamente proporcional entre essas variáveis.

Os resultados do Experimento 1 indicam os herbicidas paraquat, clethodim e quizalofop-p-tefuril serem excelentes alternativas de rotação de mecanismo de ação, visando o manejo de azevém resistente ao glyphosate. Outros resultados de pesquisa também mencionaram a viabilidade do controle de biótipos de azevém resistentes ao glyphosate com herbicidas de mecanismos de ação diferente, sugerindo entre as melhores alternativas a adoção da rotação com os inibidores de ACCase como medida preventiva CHRISTOFFOLETI et al., 2004; VARGAS et al., 2006; NEVES et al., 2010; PEREIRA, 2015; ROCKENBACH et al., 2015). Entretanto, em 2010 também foram identificados no Brasil biótipos de azevém resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ALS em lavouras de

trigo e biótipos com resistência múltipla aos inibidores de ACCase e EPSPs em lavouras de trigo, milho e soja (HEAP, 2015).

Tabela 4. Matéria seca da parte aérea de azevém (*L. multiflorum*) aos 35 dias após a aplicação (DAA) dos tratamentos herbicidas em três localidades da região de Guarapuava-PR. Guarapuava, PR - 2013. (Experimento1).

Trat	Experimento 1		Matéria Seca da Parte Aérea aos 35 DAA (g m ⁻²)		
	Aplicação de Dessecação	Dose (L ou kg p.c. ha ⁻¹)	Unicentro	Palmeirinha	Entre Rios
1	glyphosate ¹ + Assist ⁶	6,0 + 1,0	42,673 bcA	1,554 bB	30,492 bAB
2	iodosulfuron ² + Aureo ⁷	0,15 + 1,0	70,392 bA	26,868 bB	89,225 aA
3	clethodim ³ + Assist ⁶	0,8 + 1,0	4,044 cA	6,142 bA	24,357 bA
4	quizalofop ⁴ + Assist ⁶	2,0 + 1,0	0,432 cA	1,876 bA	28,262 bA
5	paraquat ⁵ + Agral ⁸	3,0 + 0,5	0,850 cA	0,807 bA	0,524 bA
6	testemunha sem aplicação	-	170,929 aA	88,119 aB	104,130 aB
F _{cal} (H)		-	55,158 *		
F _{cal} (L)		-	12,145 *		
F _{cal} (H x L)		-	4,159 *		
CV%		-	55,67		
DMS ^(5%) (H)		-	44,79		
DMS ^(5%) (L)		-	36,53		

Obs. .¹ Roundup WG[®]; ² Hussar[®]; ³ Select 240 EC[®]; ⁴ Panther 120 EC[®] = quizalofop-p-tefuriil; ⁵ Gramoxone[®]; ⁶ Assist[®] = óleo mineral; Aureo^{®/7} = éster metílico de óleo de soja; ⁸ Agral[®] = nonil fenoxi poli (etilenoxi) etanol.

- Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ETAPA 2

Os resultados complementares do Experimento 2, onde foram utilizadas plantas de azevém não controladas pelo glyphosate no Experimento 1, indicaram realmente haver um grau de tolerância ao glyphosate na localidade Unicentro superior a de Palmeirinha nos dois estádios de desenvolvimento e ambientes estudados (Tabela 5). Considerando a somatória dos tratamentos herbicidas aplicados nos Experimentos 1 e 2, as plantas de azevém do Experimento 2 foram submetidas na aplicação de glyphosate nas doses de 6480 g ha⁻¹ (4320 g ha⁻¹ Experimento 1 + 2160 g ha⁻¹ experimento 2) e 8640 (4320 g ha⁻¹ experimento 1 + 4320 g ha⁻¹ experimento 2), em ambientes de casa de vegetação e condição natural, respectivamente. Nesse sentido, observa-se que ainda assim, em torno de 20% das plantas provenientes da localidade Unicentro não foram eficientemente controladas pelo glyphosate, independentemente do estágio e local de desenvolvimento, assim como das doses utilizadas.

Felipe e Kozlowki (2014) e Souza e Kozlowki (2015) determinaram o fator de resistência (FR) de 15,9 e 5,63, respectivamente, para biótipos de azevém com suspeita de resistência ao glyphoste coletados da região de Guarapuava-PR. Vargas et al. (2005) também

constatarem fator de resistência (FR) de 16,8 entre biótipo de azevém suscetível e resistente ao glyphosate proveniente do Estado do Rio Grande do Sul, o que evidencia que as plantas resistentes podem requerer doses de até 16,8 vezes maior que as sensíveis para obter o mesmo efeito de controle. Portanto, o que comprova a existência de populações de azevém com ocorrência de biótipos com diferentes níveis de resistência ao herbicida glyphosate

Apesar de não terem sido realizados estudos de dose-resposta para os biótipos de azevém nas três localidades da região de Guarapuava-PR, as plantas no Experimento 2, e originárias do Experimento 1, foram submetidas a aplicação total de 3,6 a 4,8 vezes a dose comercial de glyphosate (RODRIGUES e ALMEIDA, 2011; SEAB, 2015) (Tabela 5). Segundo Ferreira et al. (2006), o mecanismo de resistência do azevém ao glyphosate está relacionado a menor translocação do herbicida nos biótipos resistentes em relação aos susceptíveis.

Para o clethodim observou-se excelentes níveis de controle para os biótipos de azevém com suspeita de resistência ao glyphosate em ambas localidades e condições estudadas ($\geq 89,4\%$), não confirmando a possibilidade de suspeita de resistência a esse mecanismo de ação (Tabela 5). Em trabalho de dose-resposta, Vargas et al. (2005), além de relatarem o elevado fator de resistência (FR) do biótipo resistente ao glyphosate, também observaram menor sensibilidade desse biótipo aos herbicidas inibidores da enzima ACCase. Em complemento, Vargas et al. (2013), determinaram a necessidade de aumento de 15,3 vezes a dose do herbicida clethodim para o controle eficiente do biótipo resistente de azevém.

Outro resultado interessante constatado no Experimento 2 (Tabelas 5) foi que para o azevém com 2 a 3 perfilhos submetido a aplicação do iodosulfuron-methyl em casa de vegetação, no dobro da dose do Experimento 1, ou seja, 250 g pc ha^{-1} ($12,5 \text{ g i.a. ha}^{-1}$) observou-se controle eficiente aos 30 DAA, não diferindo significativamente do tratamento com clethodim na dose de $0,8 \text{ L pc ha}^{-1}$ ($192 \text{ g i.a. ha}^{-1}$). Entretanto, para o azevém de 5 a 7 perfilhos e em condição natural de desenvolvimento, o iodosulfuron-methyl com quatro vezes a dose do Experimento 1, ou seja, 500 g pc ha^{-1} ($25,0 \text{ g i.a. ha}^{-1}$), ainda assim não obteve controle satisfatório aos 30 DAA, sendo significativamente inferior ao tratamento com clethodim. Segundo Askew et al. (2000), o controle das plantas daninhas com herbicidas em pós-emergência depende do estágio fenológico no momento da aplicação. Portanto, o desenvolvimento fenológico, assim como os fatores ambientais, são condições importantes para na eficácia dos herbicidas.

Apesar do estudo indicar apenas uma das três localidades com maior problema de controle de azevém ao herbicida glyphosate, é importante ressaltar que independente desse

resultado a adoção de medidas proativas devem compor as estratégias de manejo para retardar a evolução e propagação da resistência (MITHILA e GODAR, 2013). Atualmente, nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina já existem relatos comprovados de casos de resistência múltipla a herbicidas para o azevém (EPSPs+ACCase). No Paraná a introdução de biótipos com resistência principalmente a glyphosate pode estar relacionado principalmente à comercialização de sementes sem controle e fiscalização.

Tabela 5. Controle (%) de azevém (*L. multiflorum*) com 2 a 3 perfilhos em casa de vegetação e 5 a 7 perfilhos em ambiente natural aos 15 e 30 dias após a aplicação (DAA), utilizando plantas coletadas no Experimento 1, não controladas com o glyphosate (6,0 kg pc ha⁻¹). Guarapuava, PR - 2013. (Experimento 2)

Trat	Experimento 2 - “casa de vegetação”		15 DAA		30 DAA	
	Aplicação de Dessecação	Dose (L ou kg p.c. ha ⁻¹)	Unicentro	Palmeirinha	Unicentro	Palmeirinha
1	glyphosate ^{/1} + Assist ^{/4}	3,0 + 1,0	69,6a	86,1a	80,3bB	99,0bA
2	iodosulfuron ^{/2} + Aureo ^{/5}	0,25 + 1,0	13,3b	8,2b	92,1aA	87,0aB
3	clethodim ^{/3} + Assist ^{/4}	0,8 + 1,0	4,1bc	6,3b	94,7aA	93,5aA
4	Testemunha sem aplicação	-	0,0c	0,0b	0,0cA	0,0cA
F _{cal} (H)		-	369,070*		1691,641*	
F _{cal} (L)		-	3,181 ^{NS}		7,950*	
F _{cal} (H x L)		-	5,949*		23,036*	
CV%		-	88,83		17,78	
DMS _(5%) (H)		-	9,81		5,72	
DMS _(5%) (L)		-	7,47		4,35	
Trat	Experimento 2 - “ambiente natural”		15 DAA		30 DAA	
	Aplicação de Dessecação	Dose (L ou kg p.c. ha ⁻¹)	Unicentro	Palmeirinha	Unicentro	Palmeirinha
1	glyphosate ^{/1} + Assist ^{/4}	6,0 + 1,0	68,9aB	80,9aA	78,4bB	100,0aA
2	iodosulfuron ^{/2} + Aureo ^{/5}	0,5 + 1,0	3,0bA	3,4cA	68,6cA	70,0bA
3	clethodim ^{/3} + Assist ^{/4}	1,6 + 1,0	7,5bB	17,3bA	89,4aB	99,9aA
4	Testemunha sem aplicação	-	0,0bA	0,0cA	0,0dA	0,0cA
F _{cal} (H)		-	327,075*		872,649*	
F _{cal} (L)		-	8,211*		32,028*	
F _{cal} (H x L)		-	2,579 ^{NS}		11,377*	
CV%		-	81,70		22,12	
DMS _(5%) (H)		-	10,07		7,62	
DMS _(5%) (L)		-	7,67		5,81	

Obs. ^{/1} Roundup WG[®]; ^{/2} Hussar[®]; ^{/3} Select 240 EC[®]; ^{/4} Assist[®] = óleo mineral; Aureo^{®/5} = éster metílico de óleo de soja.
- Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.4. CONCLUSÕES

A análise conjunta das informações permite concluir que das três localidades estudadas com suspeita da presença de azevém resistente ao glyphosate, apenas uma foi caracterizada com maior evidência da presença de biótipos resistentes (Unicentro, *Campus* CEDETEG).

A suspeita de resistência do azevém ao glyphosate relatada pelos agricultores da região de Guarapuava-PR pode estar sendo motivada por outros fatores, como o uso de doses inadequadas e da qualidade da tecnologia de aplicação empregada.

Os herbicidas paraquat, clethodim e quizalofop-p-tefuril foram excelentes alternativas de rotação de mecanismo de ação para infestações de azevém com suspeita de resistência ao glyphosate na região de Guarapuava/PR..

5.5. REFERÊNCIAS

ASKEW, S.D.; SHAW, D.R.; STREET, J.E. Graminicide application timing influences red rice (*Oryza sativa*) control and seedhead reduction in soybean (*Glycine max*). **Weed Technology**, Champaign, v.14, p.176-181, 2000.

BALBINOT JR., A.A.; BIALESKI, M.; BACKES, R.L. Épocas de manejo de plantas de cobertura do solo de inverno e incidência de plantas daninhas na cultura do milho. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.18, n.3, p.91-94, 2005.

CALEGARI, A.; COSTA, M.B.B. **Adubação verde no Sul do Brasil**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1992. 346p.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; TRENTIN, R.; TOCCHETO, S.; MAROCHI, A.I.; GALLI, A.J.B.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; NICOLAI, M. Herbicidas alternativos de manejo da planta daninha azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) resistente ao herbicida glyphosate aplicado em diferentes estádios fenológicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 24., São Pedro, 2004. **Resumos...** São Pedro: SBCPD, p. 269, 2004.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no Mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Coord.) **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3. ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a resistência de Plantas aos Herbicidas (HRAC-BR), 2008. p.9-32.

DEVINE, M.D. Mechanisms of resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors: a review. **Pesticide Science**, Southampton, v.51, n.2, p.259-264, 1997.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA SOLOS - **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília-DF, 2013. 3 ed. 353p.

FELIPPE, L.E.C.; KOZLOWSKI, L.A. **Identificação de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) resistentes ao herbicida glyphosate**. Trabalho de conclusão de curso. Curitiba: PUCPR, 2014, 19p.

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**, Viçosa, v.24, n.2, p.365-370, 2006.

FLARESSO, J.A.; ALMEIDA, E.X. Introdução e avaliação de forrageiras temperadas no Alto Vale do Itajaí, Santa Catarina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.21, n.2, p.309-319, 1992.

FLOSS, E.L. Manejo forrageiro de aveia (*Avena* sp.) e azevém (*Lolium* sp.). In: PEIXOTO, A.M.; MOURA, J.C.; FARIA, V.P. SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 9., Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1988, p. 231-268.

FLOSS, E. L. Efeito do estresse hídrico sobre o rendimento das culturas. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v.87, n.1, p.33-36, 2005.

GALLI, A.J.B. A molécula glyphosate e a agricultura brasileira. In: VELINI, E.D.; MESCHEDÉ, D.K.; CARBONARI, C.A.; TRINDADE, M.L.B. **Glyphosate**. Botucatu: FEPAF, 2009. p.17-19.

HARTZLER, B. **Wich glyphosate products is best?** Disponível em: <<http://www.weeds.iastate.edu/glyphosateformulations>>. Acesso em: 15 jun 2014.

HEAP, I. **The international survey of herbicide resistant weeds**. Disponível em: <www.weedscience.org>. Acesso em: 25 mar. 2015.

IAPAR, Instituto Agrônômico do Paraná. **Agrometeorologia**. 2013. Disponível em <<http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=597/>>. Acesso em: 21 jun. 2013.

KÖPPEN, W. **Climatologia: com um estudio de los climas de La tierra**. México: Fondo de Cultura Econômica, 1948. 478p.

MARIANI, F.; VARGAS, L.; GAZZIERO, D.L.P.; KARAM, D.; AGOSTINETTO, D. Momento de avaliar erros e acertos. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v.137, n.1, p.36-41, 2013.

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

MOREIRA, M.S.; MELO, M.S. C.; CARVALHO, S.J.P.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Herbicidas alternativos para controle de biótipos de *Conyza bonariensis* e *C. canadenses* resistentes ao glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v.28, n.1, p.167-175, 2010.

MITHILA, J.; GODAR, A.S. Understanding genetics of herbicide resistance in weeds: implications for weed management. **Advance of Crop Science Technology**, v.1, n.4, p.1-3, 2013.

NEVES, R.; FADIN, D.; RIBEIRO, P.; ROMERO, F.; RUBIN, R.S.; TOFOLI, G.R.; FIORINI, M.V. Eficiência do herbicida haloxyfop-methyl no controle de azevém resistente ao glyphosate e a sua seletividade a cultura da uva. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27, Ribeirão Preto, 2010. **Resumos...** Ribeirão Preto: SBCPD, n.762, 2010.

OWEN, MJ.; POWLES, S.B. Glyphosate-Resistant Rigid Ryegrass (*Lolium rigidum*) populations in the Western Australian Grain Belt. **Weed Technology**, Champaign, v.24, n.1, p.44-49, 2010.

PRAGANA, R.B.; RIBEIRO, M.R.; NÓBREGAS, J.C.A.; RIBEIRO FILHO, M.R.; COSTA, J.A. Qualidade física de Latossolos Amarelos sob plantio direto na região do Cerrado piauiense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.36, n.5, p.1591-1600, 2012.

PEREIRA, L.V. **Alternativas para o manejo químico de azevem (*Lolium multiflorum*) e buva (*Conyza sp.*)**. 2015. 126f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. 6.ed. Londrina: IAPAR, 2011. 697 p.

ROMAN, E.S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M.A.; MATTEI, R.W. Resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v.22, n.2, p.301-306, 2004.

ROMAN, E.S.; BECKIE, H.; VARGAS, L.; HALL, L.; RIZZARDI, M.A.; WOLF, T.M. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. Passo Fundo: Berthier, 2007. 158p.

ROCKENBACH, A.P.; SCHNEIDER, T.; BIANCHI, M.A. Ryegrass control derived from isolated application with herbicides association. **Científica**, Jaboticabal, v.43, n.1, p.30-36, 2015.

RUAS, R.A.A.; LIMA, J.C.L.; APPELT, M.F.; DEZORDI, L.R. Controle de *Brachiaria decumbens* Stapf com adição de uréia à caldo do glyphosate. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.42, n.4, p.455-461, 2012.

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

SOUZA, J.S.; KOZLOWSKI, L.A. **Identificação de biótipos de azevém (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) resistentes ao herbicida glyphosate**. Trabalho de conclusão de curso. Curitiba: PUCPR, 2015, 20p.

VARGAS, L.; ROMAN, E.S.; RIZZARDI, M.A.; SILVA, V.C. Alteração das características biológicas dos biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) ocasionada pela resistência ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v.23, n.1, p.153-160, 2005.

VARGAS, L.; ROMAN, E.S.; RIZZARDI, M.A.; DE TOLEDO, R.E.B. Manejo de azevém resistente ao glyphosate em pomares de maçã com herbicida Select (clethodim). **Revista Brasileira de Herbicidas**, Maringá, v.1, p.30-36, 2006.

VARGAS, L.; MORAES, R.M.A.; BERTO, C.M. Herança da resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao glyphosate. **Planta daninha**, Viçosa, v.25, n.3, p.567-571, 2007.

VARGAS, L.; GAZZIERO, D.L.P. **Manejo de plantas daninhas tolerantes e resistentes ao glyphosate no Brasil**. In: SEMINARIO INTERNACIONAL “VIABILIDAD DEL GLYPHOSATE EN SISTEMAS PRODUCTIVOS SUSTENTABLES”. Uruguai, 2008, p. 70-74.

VARGAS, L.; FRAGA, D.S.; AGOSTINETTO, D.; MARIANI, F.; DUARTE, T.V.; SILVA, B.M. Dose-response curves of *Lolium multiflorum* biotypes resistant and susceptible to clethodim. **Planta Daninha**, Viçosa, v.31, n.4, p.887-892, 2013.

VOLENBERG, D.; STOLTENBERG, D. Altered acetylcoenzyme A carboxylase confers resistance to clethodim, fluazifop and sethoxydim in *Setaria faberi* and *Digitaria sanguinalis*. **Weed Research**, v.42, n.5, p.342-350, 2002.

VIDAL, R.A.; TREZZI, M.M. Potencial da utilização de coberturas vegetais de sorgo e milheto na supressão de plantas daninhas em condição de campo: I. Plantas em desenvolvimento vegetativo. **Planta Daninha**, Viçosa, v.22, n.2, p.217-223, 2004.

WEED SCIENCE. **International survey of herbicide resistant weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org>>. Acesso em: 12 de maio de 2015.

6. CAPÍTULO II

RAMOS, Darwin Caleff. **Variabilidade genética de genótipos de azevém resistentes e suscetíveis ao glyphosate**. 2015. 62f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Estadual do Centro Oeste, Unicentro, Guarapuava-PR.

RESUMO - O herbicida glyphosate, inibidor da enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetase (EPSP_s), tem sido amplamente utilizado para o controle de plantas daninhas. A alta pressão de seleção sobre as plantas daninhas tem selecionado biótipos resistentes, entre eles o azevém (*Lolium perene ssp. multiflorum*). Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar se há diferenças quanto a variabilidade genética em duas populações de azevém, uma resistente e uma suscetível, ao herbicida glyphosate. Para isso, plantas resistentes e suscetíveis foram coletadas em uma área agrícola no município de Guarapuava, Paraná. O DNA destas plantas foi extraído e avaliado utilizando sete marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). Estes *primers* ISSR amplificaram 83 loci, e destes, 70 apresentaram-se polimórficos. Foi observada similaridade genética de 34% entre as plantas de azevém resistentes ao herbicida glyphosate e 38% entre plantas suscetíveis. O índice de diferenciação genética Φ_{ST} (FST) de 0,07 indicou moderada estruturação das populações de azevém resistentes e suscetíveis. O dendograma de similaridade formou dois grupos, sendo um com plantas resistentes e outro com plantas suscetíveis. Os resultados obtidos demonstram que existe moderada diversidade genética na população resistente de azevém. Esta observação pode ser justificada pelo fato da espécie ser de polinização cruzada elevando a variabilidade da população resistente a cada ciclo. Isto se dá pelo cruzamento de plantas resistentes com plantas suscetíveis. Estes resultados alertam para a necessidade de controle antecipado em áreas com histórico ou suspeita de resistência, além da inerente necessidade de rotação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação.

Palavras-Chave: marcadores moleculares; ISSR; similaridade genética; EPSPs.

RAMOS, Darwin Caleff. **Genetic variability of resistant ryegrass genotypes and susceptible to glyphosate**. 2015. 62f. Dissertation (Master in Plant Production), UNICENTRO.

ABSTRACT - The glyphosate herbicide, inhibitor of the enzyme 5-enolpiruvoil-shikimate-3-phosphate synthase (EPSPs), has been widely used for weed control. A high selection pressure on weeds has selected resistant biotypes, including ryegrass (*Lolium perene ssp. multiflorum*). In this sense the objective of this study was to evaluate if there are differences in genetic variability in two populations of ryegrass, a tough and susceptible to glyphosate herbicide. For this, resistant and susceptible plants were collected in an agricultural area in Guarapuava, Paraná; The DNA of these plants were extracted and evaluated using seven ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) markers. These ISSR primers amplified 83 loci, and of these, 70 displayed polymorphism. It was observed genetic similarity of 34% between ryegrass plants resistant to the herbicide glyphosate and 38% among susceptible plants. The F_{ST} 0.07 shows moderate structuring of populations of resistant and susceptible ryegrass. The dendrogram formed two groups, one with hardy plants and the other with susceptible plants. The results shows that there moderate genetic diversity in populations resistant ryegrass. This observation can be explained by the fact that the species is cross-fertilization raising the variability of each cycle resistant population. This is done by crossing resistant plants susceptible plants. These results highlight the need for early control in areas with resistance history, beyond the inherent need for rotation of herbicides with different mechanisms of action.

Keywords: Molecular markers; ISSR; genetic similarity; EPSPs.

6.1. INTRODUÇÃO

O azevém (*Lolium perene ssp. multiflorum*) é uma espécie gramínea de ciclo anual, que se desenvolve principalmente no Sul do Brasil durante a estação fria, sendo amplamente utilizado como espécie forrageira durante o inverno. No entanto, devido suas características de dispersão, ele pode se constituir em planta daninha em culturas cultivadas na sucessão, tais como soja, trigo e milho. Além disso, plantas espontâneas de azevém é fonte de permanência das sementes e infestações futuras, comprometendo culturas de cereais de inverno como cevada, centeio, trigo e triticale (ROMAN et al., 2004).

O surgimento de plantas daninhas resistentes aos herbicidas pode ser considerado um evento recente (CHRISTOFFOLETI et al., 2003). Relatos iniciais foram desenvolvidos no final da década de 60 devido à intensiva aplicação de herbicidas. Desde então, o número de biótipos de espécies de plantas daninhas resistentes a herbicidas vem aumentando progressivamente (HRAC, 2015), sendo que no Brasil atualmente já foram reconhecidas e relatadas seis espécies resistentes ao princípio ativo glyphosate, estando entre as mesmas o azevém (WEED SCIENCE, 2015).

O glyphosate é um dos herbicidas mais utilizados nos controle de plantas daninhas no mundo. Seu mecanismo de ação constitui em inibir a enzima 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase (EPSPs), e conseqüentemente, paralisar a rota de síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais, fenilalanina, tirosina e triptofano, os quais são precursores de outros metabólitos, como lignina, alcalóides, flavonóides e ácidos benzóicos (KRUSE et al., 2000).

O primeiro caso de resistência de azevém (*Lolium perene ssp. multiflorum*) ao glyphosate foi relatado por Perez e Kogan (2003) em pomares no Chile, em média, onde foram realizadas três aplicações de glyphosate por ciclo, durante os últimos 10 anos. No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de biótipos de azevém resistentes ao glyphosate foi realizado por Roman et al. (2004) em lavouras de culturas anuais e pomares de maçã no estado do Rio Grande do Sul.

Uma das características inerentes às plantas daninhas é a ampla diversidade genética (VIDAL e JÚNIOR, 2001). Essa diversidade genética existente em uma população é o resultado do processo de evolução natural da espécie, que deriva principalmente da variação mendeliana, da hibridação interespecífica e da poliploidia (WINKLER, 2002). Uma das finalidades a ser alcançado no manejo integrado de plantas daninhas é a prevenção da seleção de biótipos resistentes a herbicidas. A detecção de alterações moleculares tem importância fundamental para viabilizar técnicas de controle, como o químico, uma vez que poderá haver respostas diferenciadas de possíveis materiais à ação de herbicidas, incrementando ou

reduzindo a eficiência de controle (VIEIRA et al., 2010). Deste modo, é de suma importância que a presença de plantas resistentes a esse herbicida seja detectada o mais cedo possível, de maneira que as estratégias de manejo possam ser estabelecidas.

Por não necessitarem que a planta complete o seu ciclo, as técnicas moleculares são importantes por acelerar os processos de análise da variabilidade e seleção, além de não sofrerem interferência do meio e ainda apresentarem alta eficiência para discriminação de materiais (Ferreira e Grattapaglia, 1998), sendo que o uso destas ferramentas para detectar e analisar a variabilidade genética em nível molecular oferecem informações adicionais a outros estudos relativos à conservação e ao uso de bancos de germoplasma (FALEIRO, 2007). Dantas et al. (2012) mencionaram a caracterização molecular como uma importante atividade para o conhecimento no que diz respeito aos germoplasmas.

Marcadores moleculares têm sido utilizados para estudos de variabilidade genética em plantas daninhas, como o descrito no trabalho de Vieira (2003), que analisou a variabilidade genética em acessos de trapoeraba (*Commelina benghalensis*) em comparação à resposta fenotípica ao herbicida glyphosate. Vidal et al. (2005) avaliaram por RAPD, o grau de similaridade genética entre acessos de picão-preto (*Bidens pilosa*) resistentes aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), bem como a relação entre o coeficiente de similaridade genética e a distância geográfica desses acessos, obtendo-se baixa similaridade genética entre os acessos, através do marcador molecular RAPD. Winkler et al. (2003), utilizando marcadores RAPD observou similaridade média de 40% em populações de leiteira (*Euphorbia heterophylla*) resistentes a herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase.

Os marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) são marcadores moleculares dominantes baseados nos microssatélites, com a vantagem de não necessitar do conhecimento prévio do genoma (REDDY et al., 2002). Essa ferramenta tem a vantagem de analisar múltiplos locos em uma única reação. Os alelos polimórficos ocorrem sempre que em um genoma ocorra deleção ou inserção em uma sequência, que modifica a distância entre as repetições microssatélites. Também, ocorre devido a diferenças no comprimento do microssatélite, principalmente nos *primers* ancorados na posição 5' (Goulão e Oliveira, 2001), sendo ainda uma técnica simples, rápida, barata, eficiente (VEIGA et al., 2011).

Os resultados obtidos com os marcadores ISSR são confiáveis, devido sua abundância e dispersão no genoma, alta reprodutibilidade, alto polimorfismo e pela rapidez em obter resultados (RODRIGUES, 2010). Além de serem usados em estudos de diversidade genética e seleção assistida, esses marcadores de DNA também podem contribuir em programas de melhoramento vegetal para seleção de genótipos a serem utilizados futuramente como

genitores de novas cultivares, pois apresentam entre os mais utilizados atualmente para várias espécies de plantas (COSTA et al., 2010). Pesquisas com os marcadores ISSR têm-se mostrado eficientes na análise da variabilidade genética em diversas espécies de plantas, tais como a manga (Rocha et al., 2012), trapoeraba (Vieira, 2003), picão-preto (Vidal et al., 2005) e o umbu-cajazeira (SANTANA et al., 2011).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi determinar a variabilidade genética de duas populações de azevém utilizando marcadores ISSR e avaliar se há estruturação entre a população resistente e a suscetível ao herbicida glyphosate.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1. Local

As análises moleculares foram realizadas no laboratório de Genética e Biologia Molecular Vegetal, do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Centro-Oeste, Unicentro, *Campus* Cedeteg, Guarapuava, Paraná.

6.2.2. Material Vegetal

O material vegetal utilizado para as análises moleculares foi formado por 30 genótipos de azevém, sendo 15 resistentes e 15 suscetíveis ao herbicida glyphosate, coletados na região de Guarapuava-PR. A fenotipagem quanto à resistência e suscetibilidade foi determinado conforme descrito no Capítulo I desta dissertação. As folhas destes indivíduos foram coletadas em sílica gel e armazenadas a -20°C até o momento da extração do DNA. Para extração do DNA, o material vegetal foi macerado em almofariz, utilizando nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó bem fino.

6.2.3. Extração do DNA

O DNA foi extraído do macerado obtido das folhas de cada genótipo de azevém, conforme protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990), com modificações. Para isso o material foi colocado em tubos de 1,5 mL, homogeneizado com o tampão de extração colocado em banho-maria por 45 minutos a 65°C, com agitações periódicas. Foram utilizados 100 mg de tecido vegetal de cada indivíduo e 700µL do tampão de extração (0,1M de Tris-HCl pH 8,0; 1,4M de NaCl; 20mM de EDTA pH 8,0; 2% (p/v) CTAB; e 0,4% (v/v) de β-mercaptoetanol) pré-aquecido a 65°C. A primeira extração dos ácidos nucleicos foi realizada com 700 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v), separando-se a fase orgânica da fase aquosa por centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante da solução foi

transferido para novo tubo, no qual foram adicionado 500 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v) e centrifugado novamente a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante dessa centrifugação foi transferido para um novo tubo, e foram realizadas sucessivas lavagens com álcool para obtenção de DNA puro, e deixado secar *overnight*. Após seco, o DNA foi ressuspendido em 100 µL de solução TE (1 mM Tris e 0,1 mM EDTA pH 8,0) e tratado com RNase a 37 °C por uma hora.

A quantificação do DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV. Para determinação da quantidade de DNA obtido de cada genótipo, foi utilizado na eletroforese quantidades conhecidas de DNA do fago λ (100, 200 e 400 ng).

6.2.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com *primers* ISSR

Para determinação da variabilidade genética nos genótipos de azevém estudados foram utilizados sete *primers* ISSR (Tabela 1). Estes *primers* foram selecionados como os melhores, entre 42 disponíveis na literatura, para estudos em azevém por Baldissera (2014). As reações de amplificação do DNA de cada genótipo via PCR foram conduzidas em volume final de 12,5 µL contendo: 20 ng de DNA, 0,2 µM de *primer*, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ e 1 U de Taq DNA Polimerase e 1X de tampão para PCR. Para a amplificação o termociclador foi programado para uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45s, temperatura de anelamento dos *primers* por 45s e 72°C por 90s. Por fim foi realizado um passo a 72°C por 5 minutos para extensão final dos fragmentos.

6.2.5. Eletroforese

Os produtos de amplificação foram resolvidos em gel de agarose 1,8% corado com brometo de etídio (0,5 µg mL⁻¹). Para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular DNA *Ladder* 100 pb. O resultado da eletroforese foi visualizado em luz UV e fotodocumentado com sistema digital.

6.2.6. Avaliação dos produtos de ampliações e análise estatística

Os indivíduos foram genotipados de acordo com a presença e ausência de bandas, a partir desses dados foi construída uma matriz binária. A porcentagem de polimorfismo de cada *primer* ISSR foi calculada dividindo o número de bandas polimórficas pelo número total de bandas amplificadas pelo referido *primer*. A similaridade genética entre os genótipos foi mensurada pelo software NTSYS 2.2 (Numerical Taxonomy Analyses System) utilizando o

coeficiente de Jaccard (ROHLF, 2007). Com base nas similaridades par-a-par foi determinada a similaridade média de cada população. O agrupamento dos indivíduos e desenho do dendrograma foi realizado pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Para determinação do índice de diferenciação genética Φ_{ST} (FST) entre as populações utilizou-se o software ARLEQUIN versão 3.11.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os sete *primers* ISSR utilizados amplificaram 83 loci, com variação de tamanho de fragmentos entre 150 a 1500 pb. Todos *primers* utilizados apresentaram bom padrão de amplificação nos 30 biótipos de azevém testados. Na Figura 1 é apresentado o padrão de amplificação do *primer* ISSR UBC 856 nos genótipos de azevém resistentes e suscetíveis ao herbicida glyphosate avaliados neste trabalho.

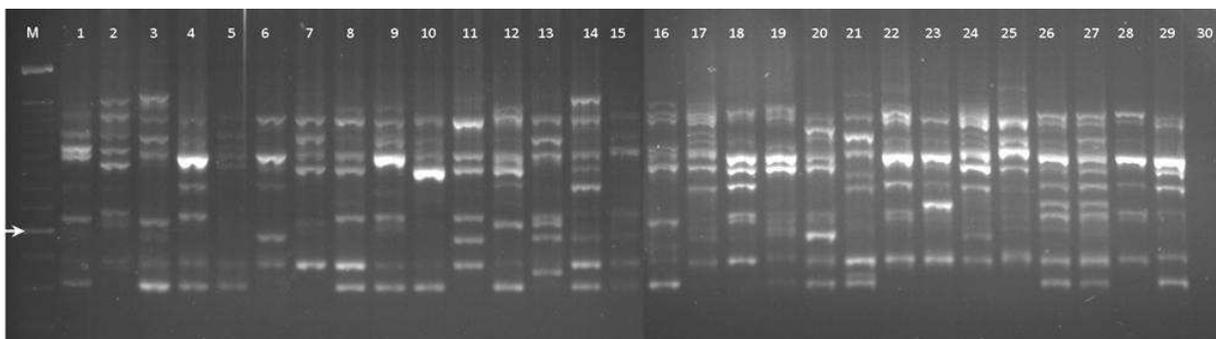


Figura 1. Gel de agarose com o padrão de amplificação do *primer* ISSR UBC 856 nos 30 genótipos de azevém. Os genótipos 1 a 15 e 16 a 30 são resistentes e suscetíveis ao herbicida glyphosate, respectivamente. A letra M indica o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb, enquanto a seta no lado esquerdo indica o fragmento de 600 pb do DNA Ladder.

Dos 83 fragmentos amplificados, 70 apresentaram-se polimórficos, demonstrando porcentagem de polimorfismo de 84,3% (Tabela 1). A média de fragmentos amplificados por *primer* foi de 11,85. Os *primers* que apresentaram maior polimorfismo foram UBC813 e UBC 873 (100%) e os menores, UBC 811 e UBC 823 (75%) (Tabela 1). Silva et al. (2010) utilizaram oito *primers* ISSR para avaliar a variabilidade genética em 46 genótipos de feijão-caupi, produzindo 62 locos, destes 49 foram polimórficos (79,04%) com 6,12 marcadores por *primer*.

A alta porcentagem de polimorfismo (84,3%) dos marcadores ISSR nas populações de azevém evidência alta variabilidade genética. Esta variabilidade pode ser explicada pelo fato

da espécie *L. multiflorum* ser uma planta de polinização cruzada, e de ampla ocorrência na região. *Primers* ISSR também são eficientes em estudo com fungos, por apresentarem elevado polimorfismo, como observado por Nghia et al. (2008) e Archana et al. (2014), que caracterizaram índice de polimorfismo de 91,50% e até 95,45%, respectivamente, para *Corynespora cassicola* e *Bipolaris oryzae*.

Tabela 1. Características dos *primers* ISSR utilizados para as análises das populações de azevém resistente e suscetível ao herbicida glyphosate, representadas pela temperatura de anelamento (TA), número total de fragmentos amplificados (NTF), número de fragmentos polimórficos (NFP) e porcentagem de polimorfismo (%P).

<i>Primer</i>	Sequência*	TA (°C)	NTF	NFP	%P
UBC 811	(GA) ₈ C	52	8	6	75
UBC 813	(CT) ₈ T	50	7	7	100
UBC 823	(TC) ₈ C	52	16	12	75
UBC 856	(AC) ₈ CTA	55	15	13	86
UBC 857	(AC) ₈ YG	54	14	11	78
UBC 873	(GACA) ₄	50	8	8	100
UBC 886	VDV(CT) ₇	55	15	13	86
			83	70	84,3

* Y = (C,T); V = (A, C, G); D = (A, G, T)

O dendrograma construído com base no índice de similaridade de Jaccard formou dois grupos (Figura 2). O grupo I foi formado por 13 (dos 15) genótipos resistentes ao glyphosate. O grupo II foi formado por 14 (dos 15) genótipos suscetíveis ao glyphosate mais o genótipo R11 (resistente). Os genótipos R15 (resistente) e S29 (suscetível) não se agruparam.

A similaridade genética média das populações de azevém foi de 34 e 38% nas populações resistentes e suscetíveis, respectivamente. Vidal et al. (2006) e Lamego et al. (2006) ao estudarem populações de picão-preto com resistência aos herbicidas inibidores da ALS obtiveram similaridade média de 27% e 37%, respectivamente, para as populações avaliadas, demonstrando existir variabilidade genética mesmo entre plantas resistentes. Isso demonstra que as plantas daninhas apresentam elevada variabilidade genética, talvez por conta das condições adversas, uma vez que crescem em ambientes hostis. Hernandez (2004) também obteve médio coeficiente de similaridade genética para *Bidens pilosa* e *Bidens sulbartenans*, variando de 22% e 50%, respectivamente, em contraste com o trabalho de Cardoso et al. (2002), com *Eichornia crassipies*, que apresentou similaridade de 90%, onde esta exclui a possibilidade de recombinação gênica pela forma de propagação. Pelas análises

genéticas, Areias et al., (2006) observaram em variedades de arroz 97% de similaridade. Essa similaridade alta se deve, principalmente, pela planta ser autógama.

De acordo com Vargas et al. (2001), a variabilidade genética elevada em uma população de plantas daninhas pode predispor-la à elevada frequência inicial do alelo de resistência, o que corresponde a um dos principais fatores que contribuem com a rápida seleção para resistência. Souframanien e Gopalakrishna (2004) analisaram a diversidade genética comparativa em 18 genótipos de *Vigna mungo*, utilizando 25 *primers* RAPD e 16 *primers* ISSR, obtiveram 42,7% e 57,5% de polimorfismo nos fragmentos amplificados pelos iniciadores RAPD e ISSR, respectivamente.

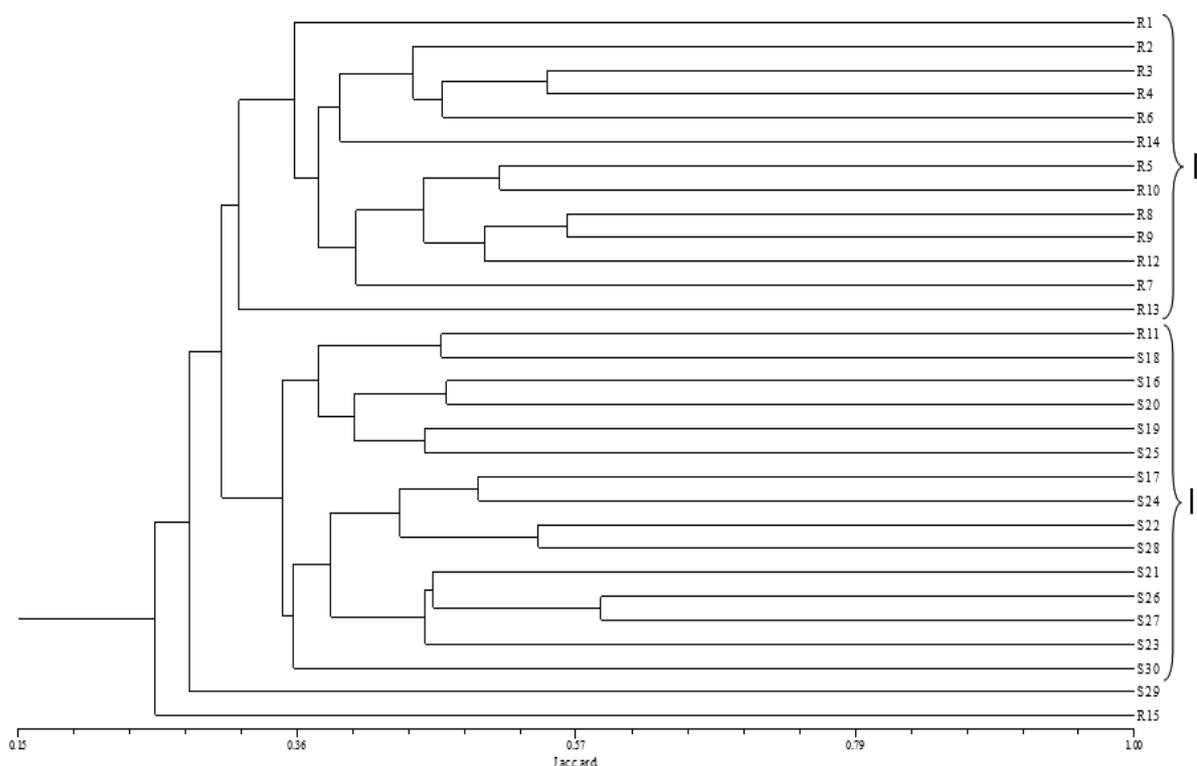


Figura 2 - Dendrograma de similaridade das duas populações de azevém construído com base no índice de Jaccard e agrupado pelo método UPGM. A letra “R” indica genótipos resistentes ao glyphosate e a letra “S” genótipos suscetíveis.

O índice de diferenciação genética (F_{ST}) varia de zero a um (0,00-1,00), onde 0,01 a 0,05; 0,06 a 0,25 e maior que 0,25 para baixa, moderada e alta diferenciação genética respectivamente. Mesmo que o F_{ST} tenha um valor mínimo teórico de zero (indicando nenhuma divergência genética) e um máximo teórico de 1 (indicando fixação de alelos alternativos em diferentes subpopulações), o máximo observado geralmente é muito menor do que 1 (HARTL e

CLARK, 2010). Analisando este índice (FST), observamos uma diferenciação moderada (0,07) das populações de azevém resistentes e suscetíveis. Isso também é possível observar no dendrograma de similaridade onde o agrupamento formou dois grupos, sendo um com plantas resistentes e outro com plantas suscetíveis. Este agrupamento pode ser devido a um "efeito fundador", o qual é definido como o estabelecimento de nova população a partir de poucos indivíduos que carregam consigo uma pequena fração da variação genética total da população parental (RIDLEY, 2003). Em plantas daninhas pode ocorrer devido ao uso frequente de um mesmo herbicida, neste caso o glyphosate, levando a população a uma maior pressão de seleção, onde alguns indivíduos podem sobreviver.

O efeito fundador provavelmente não ocorreu na área em razão de três fatores: a grande variabilidade existente entre as plantas devido ao fluxo gênico entre as plantas da área pela polinização cruzada da espécie; a dispersão de sementes na área amostrada, por meio da elevada atividade agrícola desenvolvida e através de pássaros e outros animais e, como na coleta dos acessos não se observava "ilhas" das plantas resistentes, é possível que sementes chegaram resistente e se multiplicaram, cruzando com genótipos suscetíveis levando a uma certa variabilidade mesmo na população resistente (R). As características com herança do tipo nuclear têm disseminação rápida na população, via pólen, em espécies com alta taxa de polinização cruzada, como é o caso do azevém (VARGAS et al., 2007).

Neste estudo, o uso dos marcadores ISSR foi bastante eficiente na compreensão da diversidade e estruturação genética dos biótipos de azevém, sendo capaz de detectar a existência de variabilidade entre as plantas analisadas.

6.4. CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que existe baixa similaridade entre acessos de azevém coletados na região de Guarapuava-PR. Pode ter ocorrido mais de um evento de seleção de *L. multiflorum* resistente ao herbicida glyphosate, bem como a introdução da resistência aos inibidores de EPSPs na área, mas em local distinto. Enfim, pode ter ocorrido fluxo gênico entre os biótipos na área através de máquinas, dispersão de pólen e migração de sementes.

6.5.REFERÊNCIAS

ARCHANA, B.; KINI, K.R.; PRAKASH, H.S. Genetic diversity and population structure among isolates of the brown spot fungus, *Bipolaris oryzae*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, v.13, p.238-244, 2014.

AREIAS, R.G.D.B.M., PAIVA, D.M., SOUZA, S.R. Similaridade genética de variedades crioulas de arroz, em função da morfologia, marcadores RAPD e acúmulo de proteína nos grãos. **Bragantia**, v.65, n.1, p.19-28, 2006.

BALDISSERA, G. **Seleção de primers ISSR para estudos genéticos em Azevém (*Lolium multiflorum* (Lam.) Poaceae)**. 2014. 25p. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual do Centro-Oeste.

CARDOSO, L.R., MARTINS, D., KURAMAE, E.E., TANAKA, R.H., MORI, E.S. Variabilidade genética de acessos de aguapé coletados no Estado de São Paulo. **Planta daninha**, Viçosa, v. 20, n.spe, p.1-5, 2002.

CHRISTOFFOLETI, P.J., LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Definições e situação da resistência de plantas daninhas aos herbicidas no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Coord.) **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Londrina: Associação Brasileira de Ação a resistência de Plantas aos Herbicidas (HRAC-BR), 2003. p.2-21.

COSTA, J.L.; OLIVEIRA, E.J.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, G.A.F.; NEVES, C.G. Marcadores moleculares como ferramenta para estruturação da diversidade genética em 12 genótipos de maracujazeiro. In: JORNADA CIENTÍFICA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA, 4., 2010, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2010. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Documentos, 190). 1 CD-ROM.

DANTAS, A.C.A.; NUNES, G.H.S.; ARAÚJO, S.I.; ALBUQUERQUE, L.B. Caracterização molecular de acessos de melão coletados no Nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.34, n.1, p.183-189, 2012.

DOYLE J.D.; DOYLE J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Oklahoma, v.19, n.1, p.11-15, 1987.

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. 1.ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 99 p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C.M. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, Netherlands, v.122, n.1, p.81-89, 2001.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de genética de populações**. 4. ed. Artmed, 2010. 659 p.

HERNANDES, G.C. **Resistência de *Bidens* spp. aos herbicidas inibidores de acetolactato sintase: análise de populações com marcadores moleculares e estratégias para seu manejo**. 2004. 109p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

HRAC-BR. **Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas aos Herbicidas**. Disponível em: <<http://www.hrac-br.com.br>> Acesso em: 18/03/2015.

KRUSE, N.D.; TREZZI, M.N.; VIDAL, R.A. Herbicidas inibidores da EPSPs: Revisão de literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Maringá, v.1, n.2, p.139-146, 2000.

LAMEGO, F. P.; RESENDE, L. V.; SILVA, P. R.; VIDAL, R. A.; NUNES, A. L. Distância genética e geográfica entre acessos de picão-preto suscetíveis e resistentes a herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.6, p.963-968, 2006.

NGHIA, N.A.; KADIR, J.; SUNDERASAN, E.; ABDULLAH, M.P.; MALIK, A.; NAPIS, S. Morphological and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers analyses of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Malaysia. **Mycopathologia**, Dordrecht, v.166, p.189-201, 2008.

PEREZ, A.; KOGAN, M. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. **Weed Research**, Oxford, v.43, n.1, p.12-19, 2003.

REDDY, M.P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, Dordrecht, v.128, p.9-17, 2002.

RIDLEY, M. **Evolution**. Oxford: Blackwell, 2003. 768p.

ROCHA, A.; SALOMÃO, L.C.C.; SALOMÃO, T.M.F.; CRUZ, C.D.; SIQUEIRA, D.L. Genetic Diversity of 'Ubá' Mango Tree Using ISSR Markers. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v.50, n.2, p.108-113, 2012.

RODRIGUES, J.F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. Mantiqueirae* (Flowie) Van der Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR**. Dissertação de Mestrado, 81f. ESALQ/USP. Piracicaba, 2010.

ROHLF, R. **NTSYS pc version 2.21m. Numerical taxonomy analysis system for windows**. New York, Exeter Softwares, 2007.

ROMAN, E.S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M.A.; MATTEI, R.W. Resistência de Azevém (*Lolium multiflorum*) ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v.22, n.2, p.301-306, 2004.

SANTANA, I.B.B.; OLIVEIRA, E.J.; SOARES FILHO, W.S.; RITZINGER, R.; AMORIM, E.P.; COSTA, M.A.P.C.; MOREIRA, R.F.C. Variabilidade genética entre acessos de Umbu-Cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.3, p.868-876, 2011.

SILVA, A.P.M.; DIAS, F.T.C.; CAVALCANTI, J.J.V.; BERTINI, C.H.C.M. Variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce analisada por marcadores ISSR. **Embrapa: Infoteca**. Informação Tecnológica em Agricultura, 2010.

SOUFRAMANIEN, J.; GOPALAKRISHNA, T. A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109: 1687-1693, 2004.

VARGAS, L.; BORÉN, A.; SILVA, A.A. Herança da resistência aos herbicidas inibidores de ALS em biótipos de *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, Viçosa, v.19, n.3, p.331-336, 2001.

VARGAS, L.; MORAES, R.M.A.; BERTO, C.M. Herança da resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao glyphosate. **Planta daninha**, Viçosa, v.25, n.3, p.567-571, 2007.

VEIGA, K.P.S.; ALVES, A.A.C.; MARTINS, M.I.G.; MELO, C.A.F.; CARVALHO, R. Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.9, p.1082-1088, 2011.

VIDAL, R.A.; MEROTTO JÚNIOR, A. **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 2001. 152p.

VIDAL, R.A.; LAMEGO, F.P.; RESENDE, L.V.; SILVA, P.R.; DELATORRE, C.A.; TREZZI, M.M. Similaridade genética entre acessos de *Bidens pilosa* resistentes aos herbicidas inibidores da ALS. **Planta Daninha**, Viçosa, v.23, n.3, p.551-56, 2005.

VIDAL, R.A.; HERNANDES, G.C.; WINKLER, L.M.; FEDERIZZI, L.C.; SILVA, P.R. Relação entre distância geográfica e variabilidade genética de uma população de *Bidens* spp. com resistência aos herbicidas inibidores de ALS. **Planta Daninha**, Viçosa, v.24, n.1, p.149-155, 2006.

VIEIRA, V. C.; ALVES, P.L.C.A.; PICCHI, S. C.; LEMOS, M.V.F.; SENA, J.A.D. Molecular characterization of accessions of crabgrass (*Digitaria nuda*) and response to ametryn. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.32, n.2, p.255-261, 2010.

VIEIRA, V.C. **Variabilidade genética em acessos de trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.) e suas respostas ao glifosato**. 2003. 52f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

WEED SCIENCE. **International survey of herbicide resistant weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/in.asp>> Acesso em 25/01/2015.

WINKLER, L.M.; VIDAL, R.A.; BARBOSA NETO, J.F. Aspectos genéticos envolvidos na resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Plantio Direto**, Passo Fundo, v.70, n.4, p.21-24, 2002.

WINKLER, L.M.; VIDAL, R.A.; BARBOSA NETO, J.F. Caracterização genética de *Euphorbia heterophylla* resistente a herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.9, p.1067-1072, 2003.

7. CAPÍTULO III

RAMOS, Darwin Caleff. **Qualidade e eficiência da aplicação em associação de herbicidas e adjuvantes no manejo de azevém com suspeita de resistência ao glyphosate**. 2015. 62f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Estadual do Centro Oeste, Unicentro, Guarapuava-PR.

RESUMO - A resistência de azevém ao herbicida glyphosate tem sido relatada com preocupação por vários agricultores da região do Sul do Paraná. Assim, objetivou-se avaliar a eficiência e a qualidade da aplicação da associação de glyphosate e herbicidas inibidores da enzima ACCase com o uso de adjuvantes, na dessecação de azevém (*Lolium perene ssp. multiflorum*) com suspeita de resistência na região de Guarapuava/PR. Dois experimentos foram conduzidos a campo e laboratório, contendo 12 tratamentos constituído por: glyphosate (1440 g ha⁻¹), clethodim (120 g ha⁻¹), quizalofop-p-tefuril (100 g ha⁻¹), glyphosate + clethodim (1440 + 120 g ha⁻¹), glyphosate + quizalofop-p-tefuril (1440 + 100 g ha⁻¹), associado aos adjuvantes Assist[®] (1,0 L ha⁻¹) e TA35[®] (0,1 L ha⁻¹), assim como glyphosate (1440 g ha⁻¹) associado ao adjuvante Orobor N1[®] (0,1 L ha⁻¹) e uma testemunha sem aplicação. As misturas de glyphosate com clethodim ou quizalofop-p-tefuril, ou mesmo clethodim ou quizalofop-p-tefuril isolados, foram eficientes no controle do azevém, com destaque para a rápida ação inicial glyphosate + clethodim, independentemente do adjuvante utilizado. Para todos os tratamentos não foram caracterizadas diferenças significativas entre a frequência de deposição total ou média da pulverização nas folhas de azevém. Entretanto, os menores valores médios de deposição foram constatados para o glyphosate associado apenas aos adjuvantes, o que conjuntamente com as menores tensões superficiais obtidas nas soluções com os inibidores de ACCase, sugerem que a presença desses herbicidas podem influenciar no aumento da deposição da pulverização sobre as plantas de azevém.

Palavras-Chave: *Lolium perene ssp. multiflorum*, mistura em tanque, controle, EPSPs

RAMOS, Darwin Caleff. **Quality and efficiency of application in combination of herbicides and adjuvants in the management of ryegrass with suspected resistance to glyphosate**. 2015. 62f. Dissertation (Master in Plant Production), UNICENTRO.

ABSTRACT - Ryegrass resistance to glyphosate herbicide has been reported with concern by many farmers in South Region of Parana State. Thus, the objective of this work was to assess the efficiency and quality of association application of glyphosate and ACCase enzyme inhibitors herbicides with adjuvant use, in ryegrass desiccation (*Lolium perene ssp. multiflorum*) with suspected of resistance in Guarapuava region, Parana State. Two experiments were conducted in field and laboratory conditions, containing 12 treatments constituted by: Glyphosate (glyphosate 1440 g ha⁻¹), Clethodim (120 g ha⁻¹), Quizalofop-P-Tefuril (100 g ha⁻¹), Glyphosate + Clethodim (1440 + 120 g ha⁻¹), Glyphosate + Quizalofop-P-Tefuril (1440 + 100 g ha⁻¹), associated to Assist[®] (1.0 L ha⁻¹) and TA35[®] (0.1 L ha⁻¹) adjuvant, as well as Glyphosate (1440 g ha⁻¹) associate to Orobor N1[®] (0.1 L ha⁻¹) adjuvant and a check without application. Mixtures of Glyphosate with Clethodim or Quizalofop-P-Tefuril, or even Clethodim or Quizalofop-P-Tefuril isolated, were efficient in controlling ryegrass, highlighting for fast initial action of Glyphosate + Clethodim, independently of used adjuvant. For all treatments have not been characterized significant differences between the frequency of total deposition or medium spraying in ryegrass leaves. However, the lowest medium values of deposition were observed for glyphosate associated only to adjuvant, that joint to the smallest surfaces tension obtained in solutions with ACCase inhibitors, suggest that the presence of these herbicides may influence in increasing of spray deposition over ryegrass plants.

Keywords: *Lolium perene ssp. multiflorum*, tank mixture, control, EPSPs.

7.1. INTRODUÇÃO

O azevém (*L. multiflorum*) é uma espécie gramínea de ciclo anual, que se desenvolve principalmente no Sul do Brasil durante a estação fria, sendo amplamente utilizado como espécie forrageira durante o inverno e para o fornecimento de palha para o sistema de plantio direto. É uma espécie de fácil dispersão, onde pode se constituir em planta daninha em culturas tais como soja, trigo e milho. Além disso, plantas espontâneas de azevém é fonte de permanência das sementes e infestações futuras, comprometendo culturas e incrementando o banco de sementes. Assim, tem sido considerada planta daninha em praticamente todas as lavouras de cereais de inverno e pomares da região Sul do Brasil (ROMAN et al., 2004; VARGAS et al., 2007). Além disso, a contaminação de lavouras com azevém anual inviabiliza a produção de sementes de trigo. A legislação federal estabelece que não possa haver plantas de azevém em campos de sementes de trigo (BRASIL, 2005).

Os primeiros relatos de biótipos de azevém (*L. multiflorum*) resistentes ao herbicida glyphosate ocorreram em pomares no Chile (Perez e Kogan, 2003), sendo que no Brasil o azevém foi identificado em culturas anuais e pomares de maçã no estado do Rio Grande do Sul (ROMAN et al., 2004). O problema de azevém resistente ao glyphosate se dispersou rapidamente para todos os estados do Sul do Brasil, sendo que atualmente já foram identificados biótipos com resistência múltipla ao glyphosate e aos inibidores de ACCase (acetil CoA carboxilase) e ao glyphosate e aos inibidores de ALS (acetolactato sintase) (FRAGA et al., 2012). No estado do Paraná biótipos de azevém resistente a glyphosate podem estar sendo selecionados principalmente devido à comercialização de sementes que contêm biótipos resistentes (CHRISTOFFOLETI et al., 2014).

Nesse contexto, a suspeita de falhas na dessecação do azevém com glyphosate para a semeadura do trigo e plantio de lavouras de verão, pode até inviabilizar a atividade agrícola regional, uma vez que o controle ineficiente dessa espécie pode resultar em perdas de rendimento. Segundo Vargas et al. (2013), as perdas de rendimento da atividade agrícola causadas pelo azevém podem variar de 45% a 70%, dependendo da complexidade do caso.

Portanto, aplicação repetida e continuada de um mesmo herbicida para o controle das plantas daninhas é a principal causa da seleção de biótipos resistentes. Nesse sentido, a seleção de azevém resistente ao glyphosate, aos inibidores de ALS e da ACCase representa grande impacto econômico e técnico para a agricultura brasileira (GAZZIERO et al., 2014). Para o agricultor, a razão do uso intensivo do glyphosate é o baixo custo e a alta eficácia de controle. Desta forma, a rotação de mecanismos de ação é uma ferramenta capaz de impedir a evolução da resistência ao glyphosate e deve ser adotada como medida preventiva.

De forma geral, como alternativas de manejo, temos os herbicidas de ação total paraquat e amônio-glufofosinato, assim como os graminicidas inibidores da ACCase que controlam com eficiência o azevém resistente e sensível ao glyphosate (VARGAS et al., 2013). Entretanto, todos esses herbicidas são recomendados pelos fabricantes para serem utilizados juntamente com adjuvantes, para que desenvolvam desempenho pleno em termos de eficácia (RODRIGUES e ALMEIDA, 2011).

Segundo Silva-Matte et al. (2014), a constituição da calda de pulverização é de fundamental importância para obtenção do potencial da ação do defensivo agrícola. Portanto, os adjuvantes embora não sejam ingredientes ativos, podem influenciar na qualidade e dinâmica da aplicação de forma a otimizar a performance de controle dos herbicidas. Os adjuvantes proporcionam melhorias na calda de pulverização, assim como da proteção e absorção dos herbicidas (Theisen et al., 2004), sendo fundamentais para manutenção da eficácia dos inibidores de ACCase.

O trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de alternativas de controle de azevém (*L. multiflorum*) em área do município de Guarapuava-PR com suspeita de resistência ao glyphosate, utilizando diferentes combinações de herbicidas e adjuvantes.

7.2. MATERIAL E MÉTODOS

Um experimento foi conduzido em duas etapas, sendo uma a campo e outra em laboratório, no município de Guarapuava-PR, entre maio e julho de 2014, em área com suspeita da presença da espécie azevém resistente ao controle com o herbicida glyphosate. Esta localidade pertence da área experimental do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO, *Campus* CEDETEG. A instalação do projeto foi realizada nas coordenadas geográficas S 23° 12' 28,8" de latitude, W 53° 18' 14,7" de longitude e a 1.020 m de altitude.

O solo da área foi classificado como Latossolo Bruno distrófico típico (EMBRAPA, 2013). O clima da região foi classificado como Cfb subtropical mesotérmico úmido (KÖPPEN, 1948), com verões frescos, invernos com ocorrência de geadas severas e frequentes, não apresentando estação seca. A temperatura média máxima anual é de 23,5°C e a temperatura média mínima anual é de 12,7°C (IAPAR, 2013). Na Figura 1, verificam-se os dados meteorológicos referentes ao período de execução do trabalho

No conjunto do trabalho, dois experimentos foram conduzidos a campo, visando avaliar a eficácia da associação de glyphosate com herbicidas inibidores da enzima ACCase no controle de azevém (Experimento 1), assim como utilizando-se o traçador azul brilhante

(catalogado internacionalmente pela Food, Drug e Cosmetic como FD e C Blue n.1, 1500 ppm), em todas nas soluções herbicidas estudadas, para estimar a qualidade de deposição da aplicação e a tensão superficial estática de todos os tratamentos (Experimento 2).

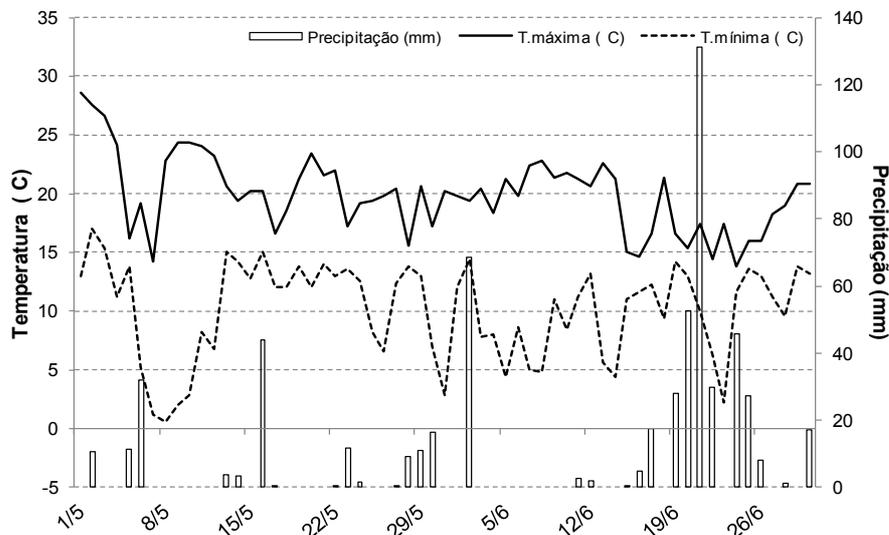


Figura 1. Dados meteorológicos referentes aos meses de maio a julho de 2013, período no qual foram conduzidas as avaliações. Guarapuava-PR, 2014.

O delineamento experimental dos experimentos foi representado por blocos casualizados constituídos por doze tratamentos (Tabela 1), com quatro e vinte repetições, respectivamente, para os experimentos 1 e 2. Quanto as unidades experimentais, no Experimento 1 foram representadas por parcelas com dimensões de 4,0 x 6,0 metros (24 m²), sendo que no momento das avaliações, desconsiderou-se 0,50 m das extremidades e uma linha lateral das parcelas. No Experimento 2, para determinação da deposição da calda de pulverização dos herbicidas, as unidades experimentais foram representadas pelos alvos biológicos de um perfilho com três folhas para as plantas de azevém.

A aplicação dos tratamentos foi realizada em 25/05/2013 utilizando um pulverizador costal pressurizado a CO₂, equipado com barra de seis pontas TTi 110.015, espaçadas entre si em 0,5 m e a 0,5 m de altura das plantas, com pressão de trabalho de 2,0 kgf cm⁻² e velocidade de deslocamento de 3,6 km h⁻¹, o que constituiu taxa de aplicação de 200 L ha⁻¹. As condições climáticas durante a aplicação foram monitoradas com um termo-anômetro digital e registraram no horário inicial (15h05m) e final (15h55m), média da umidade relativa do ar, temperatura e velocidade dos ventos foram, respectivamente, de 59,6% a 68,7%; 20,4 a 17,9°C e ventos de 1,5 a 2,1 km h⁻¹. No momento das aplicações a infestação de azevém encontrava-se altamente perfilhadas, com touceiras de 7 a 10 perfilhos em estágio fenológico de desenvolvimento vegetativo, não sendo ainda caracterizado emissão de inflorescências.

Tabela 1 - Tratamentos e doses realizadas para dessecação do azevém com suspeita de resistência ao glyphosate, Guarapuava/PR.

Trat.	Herbicidas	Dose (L ou kg pc ha ⁻¹)	Dose (g i.a. ou e.a. ha ⁻¹)
1	Glyphosate + Assist ^{®1}	2,0 + 1,0	1440 + 1,0
2	Clethodim + Assist [®]	0,5 + 1,0	120 + 1,0
3	Quizalofop ² + Assist [®]	1,0 + 1,0	100 + 1,0
4	Glyphosate + Clethodim + Assist [®]	2,0 + 0,5 + 1,0	1440 + 120 + 1,0
5	Glyphosate + Quizalofop + Assist [®]	2,0 + 1,0 + 1,0	1440 + 100 + 1,0
6	Glyphosate + TA35 ^{®3}	2,0 + 0,1	1440 + 0,1
7	Clethodim + TA35 [®]	0,5 + 0,1	120 + 0,1
8	Quizalofop + TA35 [®]	1,0 + 0,1	100 + 0,1
9	Glyphosate + Clethodim + TA35 [®]	2,0 + 0,5 + 0,1	1440 + 120 + 0,1
10	Glyphosate + Quizalofop + TA35 [®]	2,0 + 1,0 + 0,1	1440 + 100 + 0,1
11	Glyphosate + Orobor N1 ^{®4}	2,0 + 0,1	1440 + 0,1
12	Testemunha sem aplicação	-	-

Obs. ¹ Assist[®] = óleo mineral; ² Quizalofop = quizalofop-p-tefúril; ³ TA35[®] = nonil fenoxi poli (etilenoxi) etanol; ⁴ Orobor N1[®] = óleo vegetal.

As características avaliadas no Experimento 1 foram porcentagem de controle do azevém aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a aplicação (DAA), por meio de escala de notas visuais (SBCPD, 1995), onde 0% correspondeu à ausência de injúrias e 100% à morte das plantas. No Experimento 2, para determinar o depósito da pulverização dos herbicidas, o procedimento de recuperação das soluções traçadoras constituídas pelas caldas de pulverização foi desenvolvido conforme metodologia utilizada por Maciel et al. (2007; 2014). Esse procedimento foi desenvolvido através da lavagem das plantas alvo (*L. multiflorum*) com volume de 20 mL de água destilada em sacos plásticos, através de agitação constante por 20 segundos. A determinação das quantidades do traçador depositada em cada amostra foi realizada utilizando-se de procedimentos de espectrofotometria. Os resultados em absorbância das leituras, no comprimento de onda 630 nm foram transformados em $\mu\text{g L}^{-1}$, de acordo com o coeficiente angular da curva-padrão. Os valores de depósito da pulverização foram posteriormente transformados em $\mu\text{L.g}$ de matéria seca⁻¹, uma vez que as plantas alvo após coleta e lavagem foram acondicionados em sacos de papel, e secas em estufa de circulação forçada de ar, por período de 72 horas a 65 °C.

Para a determinação das tensões superficiais estáticas das soluções utilizou-se a metodologia descrita por Mendonça et al. (2007) e Maciel et al. (2010), a qual refere-se a mensurar a massa das gotas formadas na extremidade de uma bureta posicionada dentro de uma balança analítica (precisão de 0,001 mg), em tempo determinado entre 25 a 30 segundos.

Cada conjunto de duas gotas pesadas correspondeu a uma repetição, onde para evitar perdas por evaporação utilizou-se para captura das gotas óleo vegetal em um Becker de 25 mL, posicionado abaixo da ponta da bureta e sobre o prato da balança.

Os dados de controle de azevém foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as suas médias agrupadas pelo teste de Scott e Knott (1974) ($p \leq 0,05$). Com os dados médios de controle aos 28 e 35 DAA, também foi calculado o incremento médio de eficiência de controle (IEC%) dos tratamentos em relação as associações de glyphosate com os adjuvantes Assist[®] e TA35[®], de forma semelhante à utilizada por Rockenbach et al. (2015):

$$\text{IEC\%} = \text{E}_{\text{Ctr}} - \text{EM}_{\text{Ctr}} \dots \dots \dots (1)$$

Onde, E_{Ctr} representa a eficiência de controle do tratamento desejado e EM_{Ctr} a média da eficiência de controle do tratamento glyphosate com os adjuvantes Assist[®] e TA35[®], sendo que os valores negativos foram considerados como zero.

A comparação entre os valores de deposição e tensão superficial das soluções foi realizada através do Intervalo de Confiança para diferenças entre as médias, a 5% de probabilidade (IC95%). Os resultados de deposição das soluções também foram ainda demonstrados na forma de suas frequências acumuladas, permitindo assim uma interpretação biológica mais ampla dos resultados.

7.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Todos os tratamentos com as misturas entre os herbicidas glyphosate e os inibidores da ACCase (clethodim e quizalofop-p-tefural) apresentaram controle de azevém aos 7 DAA significativamente superior aos herbicidas aplicados isolados, independentemente do tipo de adjuvante utilizado (Tabela 2). Essa maior velocidade de ação provavelmente esta condicionada a melhoria dos processos de absorção e translocação resultante da interação entre as diferentes moléculas e/ou formulações dos herbicidas. Normalmente, tanto os inibidores de ACCase como o glyphosate demoram mais para apresentar sintomas de danos nas plantas em razão da lenta translocação e do mecanismo de ação atuar nos meristemas (ROMAN et al., 2007; RODRIGUES e ALMEIDA, 2011)

As associações de glyphosate + clethodim ou glyphosate + quizalofop-p-tefural com o adjuvante Assist[®] constituíram excelente níveis de controle do azevém (90,3% e 92,0%) aos 14 DAA, mas não diferindo do tratamento glyphosate + clethodim + TA35[®] (87,0%) (Tabela 2). Nesse período, apesar do tratamento glyphosate + quizalofop-p-tefural + TA35[®] ter

obtido controle satisfatório (80,0%), segundos critérios da SBCPD (1995), foi significativamente inferior as demais misturas de glyphosate e os inibidores da ACCase. Esses resultados evidenciam a possibilidade de efeito sinérgico, e conseqüentemente, a maior velocidade de ação dessas misturas sobre azevém, em relação à eficiência dos produtos aplicados isolados, os quais no referido período apresentaram controle insatisfatório, variando entre 10,3 e 65,0%. Esses resultados corroboram com os observados por Christoffoleti et al. (2005), que também descreveram a resposta rápida da ação de glyphosate + clethodim, independentemente do estágio de crescimento do azevém, assim como por Rockenbach et al. (2015), utilizando as misturas de glyphosate + clethodim, glyphosate + quizalofop-p-terfúril e glyphosate + fluazifop-p-butyl.

Essa característica de efeito sinérgico entre as associações de glyphosate com inibidores da ACCase já foi relatada por Adegas et al. (2010) e Melo et al. (2012) e Barroso et al. (2014) para o manejo de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao glyphosate, com eficiência similar a encontrada para azevém, utilizando associações de glyphosate ao clethodim, tepraloxymid, fluazifop-p-butyl e haloxyfop-methyl, quizalofop p-terfúril, sendo que em todos foram utilizados adjuvantes recomendados pelos fabricantes.

As misturas de glyphosate + clethodim ou glyphosate + quizalofop-p-terfúril associadas aos adjuvantes Assist[®] e TA35[®] apresentaram excelentes níveis de controle de azevém a partir dos 21 DAA, os quais foram mantidos significativamente superiores a todos os demais tratamentos até os 35 DAA (Tabela 2). De forma contrária, para as associações dos herbicidas clethodim com os adjuvantes Assist[®] ou TA35[®] e quizalofop-p-terfúril com Assist[®], observou-se que o controle de azevém manteve-se em níveis insatisfatórios até os 28 DAA (< 78,3%), mas ainda significativamente superiores à associação de quizalofop-p-terfúril + TA35[®], no referido período (57,0%). Aos 35 DAA, todos os herbicidas inibidores de ACCase isolados ou em misturas com glyphosate, independente da associação com os adjuvantes Assist[®] e TA35[®], constituíram controle eficiente de azevém, e significativamente superiores ao glyphosate isolado. Entretanto, é importante considerar que a utilização de adjuvantes é importante para a boa absorção e eficiência dos herbicidas inibidores da ACCase (Roman et al., 2007) assim como em alguns casos, o potencial dos adjuvantes pode até mesmo diminuir o risco de deriva das pulverizações (CUNHA et al. 2010; CHECHETTO et al., 2013).

Os resultados de incremento médio de eficiência dos tratamentos ao glyphosate com os adjuvantes, indicam melhorias expressivas no ganho de performance de controle do azevém 28 e 35 DAA, principalmente para as misturas dos herbicidas alternativos associados aos adjuvante TA35[®] e Assist[®] (Figura 2).

Tabela 2 - Controle de azevém (*L. multiflorum*) aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a aplicação (DAA) de glyphosate com ou sem herbicidas inibidores da ACCase (clethodim, quizalofop-p-tefúril) e adjuvantes (Assist[®], TA35[®] e Orobor N1[®]). Guarapuava - PR, 2013.

Trat.	Herbicidas	Dose (L ou kg pc ha ⁻¹)	Controle % azevém (<i>L. multiflorum</i>)				
			7 DAA	14 DAA	21 DAA	28 DAA	35 DAA
1	Glyphosate + Assist ^{®1}	2,0 + 1,0	20,3 C	65,0 C	79,0 B	74,0 C	89,3 C
2	Clethodim + Assist [®]	0,5 + 1,0	3,5 E	21,5 E	65,8 D	78,3 B	92,8 B
3	Quizalofop ² + Assist [®]	1,0 + 1,0	3,0 E	12,5 F	51,3 F	78,3 B	94,0 B
4	Glyphosate + Clethodim + Assist [®]	2,0 + 0,5 + 1,0	40,8 A	90,3 A	95,5 A	97,8 A	99,0 A
5	Glyphosate + Quizalofop + Assist [®]	2,0 + 1,0 + 1,0	30,3 B	92,0 A	93,0 A	97,3 A	98,5 A
6	Glyphosate + TA35 ^{®3}	2,0 + 0,1	12,0 D	58,8 C	72,0 C	71,5 C	83,8 D
7	Clethodim + TA35 [®]	0,5 + 0,1	3,0 E	19,5 E	59,0 E	75,8 B	91,5 C
8	Quizalofop + TA35 [®]	1,0 + 0,1	4,3 E	10,3 F	46,3 F	57,0 D	90,5 C
9	Glyphosate + Clethodim + TA35 [®]	2,0 + 0,5 + 0,1	32,3 B	87,0 A	92,3 A	96,0 A	98,5 A
10	Glyphosate + Quizalofop + TA35 [®]	2,0 + 1,0 + 0,1	27,0 B	80,0 B	89,5 A	94,0 A	96,5 A
11	Glyphosate + Orobor N1 ^{®4}	2,0 + 0,1	17,8 C	48,3 D	66,3 D	72,0 C	82,0 D
12	Testemunha sem aplicação	-	0,0 E	0,0 G	0,0 G	0,0 E	0,0 E
Fcal	-	-	53,015*	156,941*	182,597*	362,849*	522,103*
CV	-	-	23,62	11,33	5,93	3,76	2,81

Obs. ¹ Assist[®] = óleo mineral; ² Quizalofop = quizalofop-p-tefúril; ³ TA35[®] = nonil fenoxi poli (etilenoxi) etanol; ⁴ Orobor N1[®] = óleo vegetal. - Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo agrupamento do teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

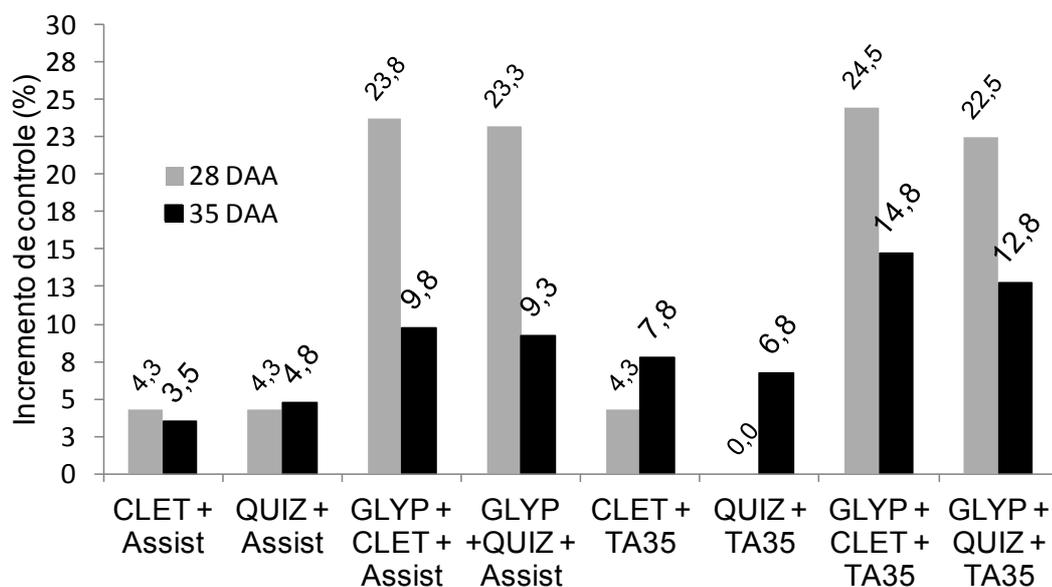


Figura 2 - Incremento médio de eficiência de controle (IEC%) de azevém (*L. multiflorum*) obtida com os herbicidas associados aos adjuvantes aos 28 e 35 dias após a aplicação (DAA), em relação ao glyphosate com Assist[®] e TA35[®]. Guarapuava - PR, 2013.

Em relação à deposição da pulverização, não foram caracterizadas diferenças expressivas na dinâmica de comportamento dos tratamentos em relação frequência e média dos depósitos nas folhas de azevém (Figura 2). Entretanto, embora os menores valores médios

de deposição tenham sido constatados para o glyphosate associado apenas aos adjuvantes, o que juntamente com as informações de menores tensões superficiais obtidas nas soluções com os inibidores de ACCase (Figura 3), sugerem que a presença dos herbicidas inibidores de ACCase podem estar condicionando maior aumento da deposição da pulverização sobre as plantas de azevém que os próprios adjuvantes. Esses resultados corroboram com o descrito por Maciel et al. (2001), em que não foram encontradas alterações significativas na deposição da pulverização em folhas de *I. grandifolia*, com ou sem a adição de adjuvantes. Contudo, a eficácia do controle químico pode estar relacionada ao aumento do espalhamento das gotas de pulverização promovido pelo adjuvantes sobre as superfícies foliares, devido à redução da tensão superficial (Rodrigues-Costa et al., 2010). Alguns adjuvantes multifuncionais utilizam em sua formulação uma mistura de aditivos, como óleo mineral ou vegetal, surfatantes não iônicos, sequestrantes de cátions, acidificantes, entre outras substâncias (DAN et al., 2010).

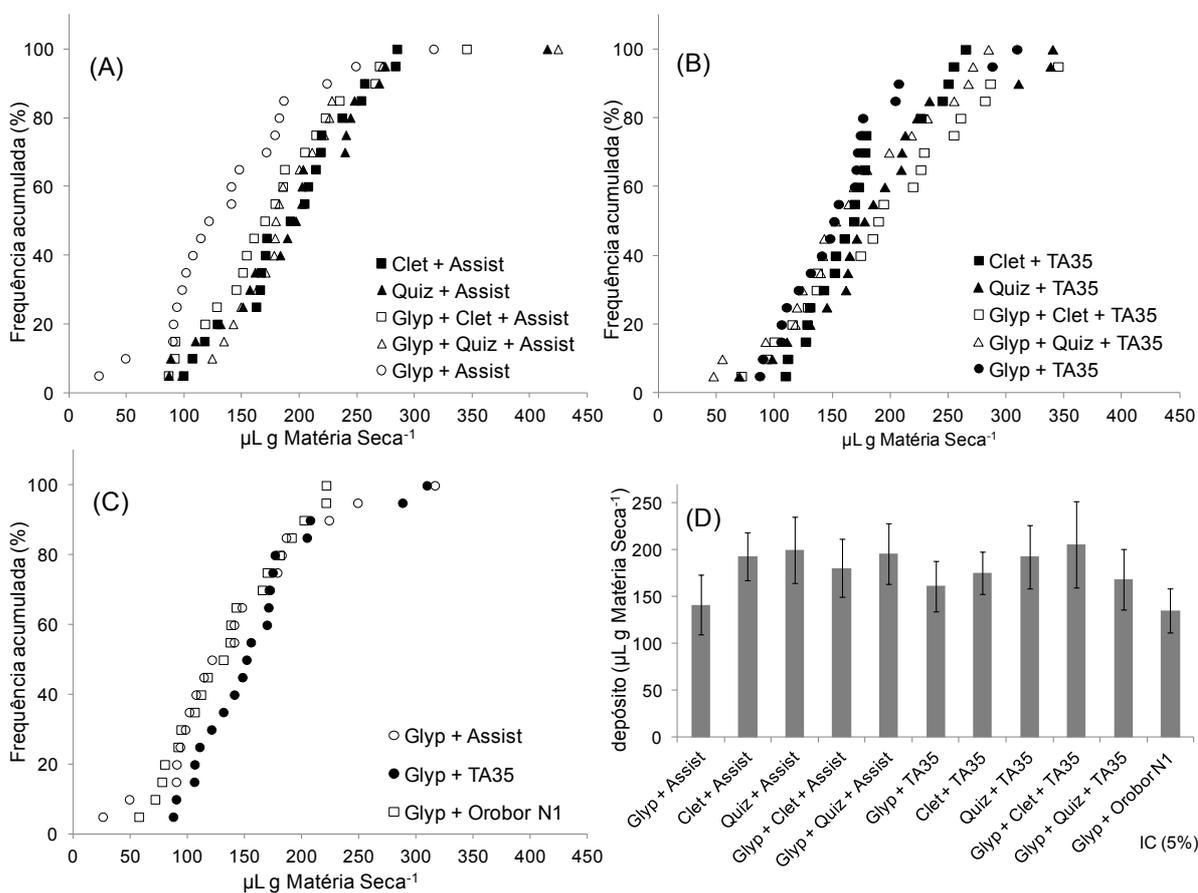


Figura 3. Frequências acumuladas da deposição (A, B, C) e média total (D) da calda de pulverização em plantas de azevém utilizando associações de glyphosate (glyp) com ou sem os herbicidas inibidores da ACCase (clet = clethodim, quiz = quizalofop-p-tefuril) e adjuvantes (Assist[®], TA35[®] e Orobor N1[®]). Guarapuava - PR, 2013.

Cunha e Alves (2009), avaliando diferentes propriedades físico-químicas de soluções aquosas contendo adjuvantes agrícolas, observaram que a adição do nonil fenol etoxilado+óxido de etileno, reduziu a tensão superficial. Bueno et al. (2013), trabalhando com volumes de calda e adjuvante no controle de plantas daninhas com glyphosate, concluíram que o adjuvante nonil fenol etoxilado adicionado à calda de pulverização, em relação à calda somente com glyphosate, promoveu alterações de pequena magnitude nas propriedades físico-químicas da solução. Trabalhos de Mendonça et al. (1999), avaliando a tensão superficial de soluções do herbicida glyphosate associado a surfatantes, observaram decréscimo dos valores de tensão superficial quando se acrescentaram às soluções os surfatantes.

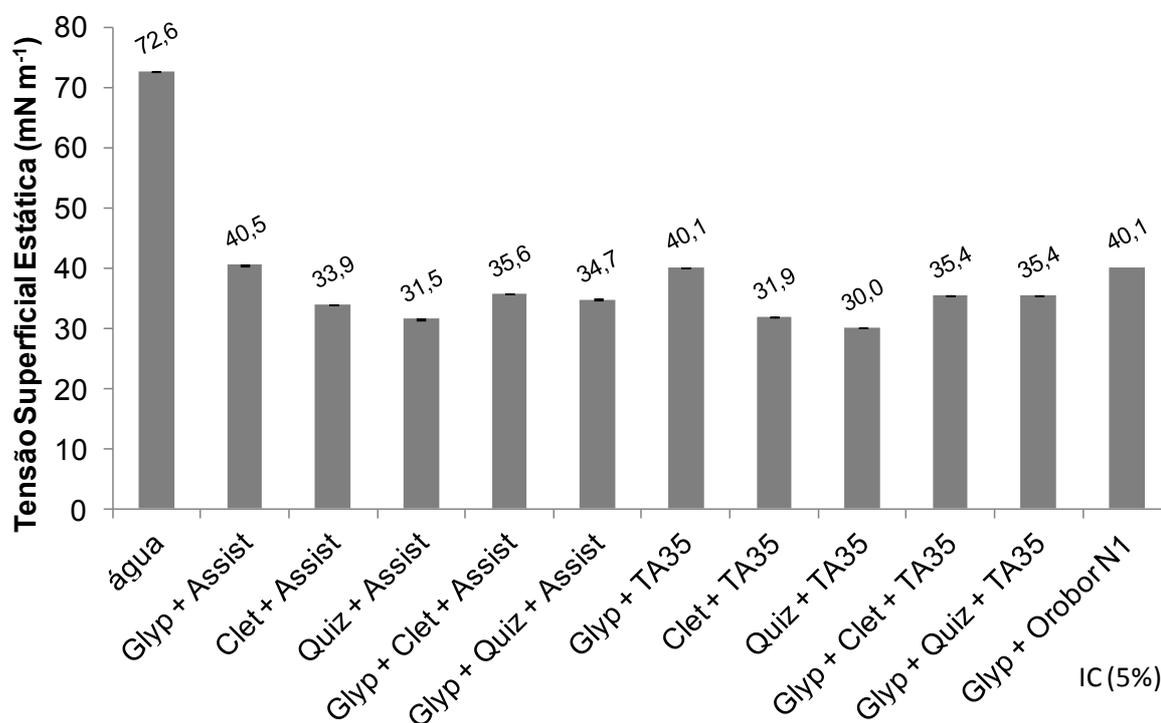


Figura 4. Tensão superficial estática da calda de pulverização com associações de glyphosate (glyp) com e sem herbicidas inibidores da ACCase (clet = clethodim, quiz = quizalofop-p-tefuril) e adjuvantes (Assist[®], TA35[®] e Orobor N1[®]). Guarapuava-PR, 2013.

Mesmo com um controle eficaz do azevém com as associações de glyphosate e inibidores de ACCase, outras estratégias de controle são fundamentais no manejo de plantas daninhas, principalmente em se tratando de espécies com susperita de resistência.

7.4. CONCLUSÕES

As misturas de glyphosate com clethodim ou quizalofope-p-tefuril, ou mesmo clethodim ou quizalofope-p-tefuril isolados, foram eficientes no controle do azevém com

suspeita de resistência ao glyphosate, com destaque para a rápida ação inicial glyphosate + clethodim, independentemente do adjuvante utilizado.

Para todos os tratamentos não foram caracterizadas diferenças significativas entre a frequência de deposição total ou média da pulverização nas folhas de azevém, onde os menores valores médios de deposição foram constatados para o glyphosate associado apenas aos adjuvantes.

As menores tensões superficiais foram obtidas nas soluções com os inibidores de ACCase, onde a presença desses herbicidas podem influenciar no aumento da deposição da pulverização sobre as plantas de azevém.

7.5. REFERÊNCIAS

ADEGAS, F. S.; GAZZIERO, D. L. P.; VOLL, E.; OSIPE, R. Alternativas de controle químico de *Digitaria insularis* resistente ao glyphosate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 2010, Ribeirão preto. Resumos... Responsabilidade social e ambiental no manejo de plantas daninhas. Ribeirão Preto: SBCPD, 2010. p. 756-760.

BARROSO, A.A.M.; ALBRECHT, A.J.P.; REIS, F.C.; FILHO, R.V. Interação entre herbicidas inibidores da accase e diferentes formulações de glyphosate no controle de capim-amargoso. **Planta daninha**, Viçosa, v. 32, n. 3, p. 619-627, 2014.

BUENO, M.R.; ALVES, G.S.; PAULA, A.D.M. CUNHA, J.P.A.R.. Volumes de calda e adjuvante no controle de plantas daninhas com glyphosate. **Planta daninha**, vol.31, n.3.p 705-713, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 25. Padrão para produção e comercialização de sementes de trigo e trigo duro. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília**, DF 20 dez. 2005.

CHECHETTO, R. G.; ANTUNIASSI, U. R.; MOTA, A. A. B.; CARVALHO, F. K.; SILVA, A. C. A.; VILELA C. M. Influência de pontas de pulverização e adjuvantes no potencial de redução de deriva em túnel de vento. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, p.37-46, 2013

CHRISTOFFOLETI, P.J.; TRENTIN, R.; TOCCHETTO, S.; MAROCHI, A.; GALLI, A.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F.; NICOLAI, M. Alternative herbicides to manage Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) resistant to glyphosate at different phenological stages. **Journal of Environmental Science and Health, Part B. Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v.40, n.1, p.59-67, 2005.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; NICOLAI, M.; MELO, M.S.C. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. In: MONQUERO, P.A. (Coord.). **Aspectos da biologia e manejo de plantas daninhas**. São Carlos: Editora RiMA, 2014, p. 257-283.

- CUNHA, J. P. A. R.; ALVES, G. S. Características físicoquímicas de soluções aquosas com adjuvantes de uso agrícola. **Interciência**, v. 34, n. 9, p. 655-659, 2009.
- CUNHA, J. P. A. R.; BUENO, M. R.; FERREIRA, M. C. Espectro de gotas de pontas de pulverização com adjuvantes de uso agrícola. **Planta Daninha**, v.28, p.1153-1158, 2010.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro, 2006. 306p.
- FRAGA, D.S.; VARGAS, L.; MARIANI, F.; AGOSTINETO, D. RUBIN, R.S.; PERBONI, L.T. Distribuição geográfica de azevém resistente a herbicidas inibidores da enzima ACCase e da EPSPs no estado do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 28., 2012, Campo Grande. A ciência das plantas daninhas na era da biotecnologia. **Anais...** Campo Grande: SBCPD, 2012. 1 CD-ROM.
- FORNAROLLI, D. A. et al. Manejo de biótipos de *Digitaria insularis* resistente ao herbicida glifosato. In: III SIMPÓSIO SINTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE: Uso Sustentável, 3., Botucatu. **Anais...** Botucatu: 2011. p. 317-320.
- GAZZIERO, D.L.P.; KARAM, D.; ADEGAS, F.S.; VARGAS, L.; VOLL, E. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. In: MONQUERO, P.A. (Coord.). **Aspectos da biologia e manejo de plantas daninhas**. São Carlos: Editora RiMA, 2014, p. 229-234.
- IAPAR, Instituto Agrônomo do Paraná. **Agrometeorologia**. 2013. Disponível em <<http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=597/>>. Acesso em: 21 jun. 2013.
- KÖPPEN, W. **Climatologia: com um estudio de los climas de La tierra**. México: Fondo de Cultura Econômica, 1948. 478p.
- MACIEL, C.D.G.; VELINI, E.D.; RAETANO, C.G.; SOUZA, R.T.; NEGRISOLI, E.; CAVENAGHI, A.L.; SILVA, M.A.S. Estimativa de depósito e distribuição da calda de pulverização em papel hidrossensível e plantas de *Ipomoea grandifolia*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIA DE APLICAÇÃO DE AGROTÓXICOS, 2., 2001, Jundiaí - SP. **Anais...** Jundiaí: IAC, 2001
- MACIEL, C.D.G.; VELINI, E.D.; BERNARDO, R.S. Desempenho de pontas de pulverização em *Brachiaria brizantha* cv. MG- 4 para o controle de ninfas de cigarrinhas das pastagens. **Engenharia Agrícola**, v.27, n.esp., p.66-74, 2007.
- MACIEL, C.D.G.; GUERRA, N.; OLIVEIRA NETO, A.M.; POLETINE, J.P.; BASTOS, S.L.W.; DIAS, N.M.S. Tensão superficial estática de misturas em tanque de glyphosate e + chlorimuron-ethyl isoladas ou associadas com adjuvantes. **Planta Daninha**, Viçosa, v.28, n.3, p.673-685, 2010.
- MACIEL, C.D.G.; OLIVEIRA NETO, A.M.; SILVA, A.A.P.; KARPINSKI, R.A.K.; BARBOSA, A.P.; SILVA, A.F.M.; MENDES, M.A.; HELVIG, E.O. Efficiency and quality of glyphosate + carfentrazone application in controlling *Commelina diffusa* depending on the spray nozzles and Triunfo FlexTM adjuvant. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Maringá, v.13, n.2, p.156-162, 2014.

MELO, M.S.C.; ROSA, L.E.; BRUNHARO, C.A.C.G.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Alternativas para o controle químico de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao glyphosate. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 2, n. 11, p. 195-203, 2012.

MENDONÇA, C.G.; VELINI, E.D.; MARTINS, D.; MENDONÇA, C.G. Efeitos de surfatantes sobre a tensão superficial e a área de molhamento de soluções de glyphosate sobre folhas de tiririca. **Planta Daninha**, Londrina, v.13, n.3, p.355-65, 1999.

MENDONÇA, C.G.; RAETANO, C.G.; MENDONÇA, C.G. Tensão superficial estática de soluções aquosas com óleos minerais e vegetais utilizados na agricultura. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v.27, n.esp., p.16-23, 2007.

PEREZ, A.; KOGAN, M. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. **Weed Research**, Oxford, v.43, n.1, p. 12-19, 2003.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 6.ed. Londrina: IAPAR, 2011. 697 p.

RODRIGUES-COSTA, A.C.P.; COSTA, N.V.; CARDOSO, L.A.; PEREIRA, M.R.R.; MARTINS, D. Avaliação de pontas de jato plano na deposição da calda de pulverização com diferentes combinações de plantas de feijão, *Brachiaria plantaginea* e *Bidens pilosa*. **Planta daninha**, Viçosa, v.28, edição especial, p.1159-1171, 2010.

ROMAN, E.S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M.A.; MATTEI, R.W. Resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 2, p. 301-306, 2004.

ROMAN, E.S.; BECKIE, H.; VARGAS, L.; HALL, L.; RIZZARDI, M.A.; WOLF, T.M. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. Passo Fundo: Berthier, 2007. 158p.

ROCKENBACH, A.P.; SCHNEIDER, T.; BIANCHI, M.A. Ryegrass control derived from isolated application with herbicides association. **Científica**, Jaboticabal, v.43, n.1, p.30-36, 2015.

SILVA-MATTE, S.C.; COSTA, N.V.; PAULY, T.; COLTRO-RONCATO, S.; OLIVEIRA, A. DA C.; CASTAGNARA, D.D. Variabilidade da quebra da tensão superficial da gota pelo adjuvante (Aureo[®]) em função de locais de captação de água. **Revista Agrarian**, v.7, n.24, p.264-270, 2014.

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

SCOTT, A.J.; KNOTT, M. A Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, p.507-512, 1974.

THEISEN, G.; RUEDELL, J.; BIANCHI, M.A. Tecnologia de Aplicação de Herbicidas: Teoria e Prática. In: THEISEN, G.; RUEDELL, J. (Eds.). **Aspectos técnicos da aplicação de herbicidas**. Cruz Alta: Aldeia Norte, 2004, p.25-54.

VARGAS, L.; MORAES, R.M.A.; BERTO, C.M. Herança da resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao glyphosate. **Planta daninha**, Viçosa, v. 25, n. 3, p. 567-571, 2007.

VARGAS, L.; GAZZIERO, D.L.P.; KARAM, D. **Azevém resistente ao glifosato: características, manejo e controle**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2011. 4 p. html. (Embrapa Trigo. Comunicado Técnico online, 298). Disponível em:<http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co298.htm>. Acesso em: 11 jun. 2014

VARGAS, L.; AGOSTINETO, D.; GAZZIERO, D.L.P.; KARAM, D. Resistência de plantas daninhas no Brasil: histórico, custo, e o desafio do manejo no futuro. In: RIOS, A. (Ed). **Viabilidad Del glifosato em sistemas productivos sustentables**. Montevideo: INIA, 2013. p. 111-118 (INIA. Serie Técnica, 204).

VARGAS, L.; FRAGA, D.S.; AGOSTINETTO, D.; MARIANI, F.; DUARTE, T.V.; SILVA, B.M. Dose-response curves of *Lolium multiflorum* biotypes resistant and susceptible to clethodim. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 887-892, 2013.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A rotação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação, como paraquat, clethodim e quizalofop-p-tefurilico são alternativas eficazes para controle de azevém com suspeita de resistência ao glyphosate na região de Guarapuava-PR.

O controle de azevém na região de Guarapuava-PR pode não estar sendo manejado com tecnologia adequada, superestimando a ocorrência de áreas com suspeita de resistência ao glyphosate, em função de erros de tecnologia de aplicação, os quais podem envolver dose e uso de adjuvantes.

Os resultados sugerem o controle antecipado das plantas de azevém, principalmente em áreas com histórico de resistência, visando não produzir e multiplicar sementes.

Recomenda-se que sejam adotadas outras medidas de controle, além do controle químico, para que o problema com plantas resistentes ao glyphosate, entre elas o azevém, fiquem cada vez menos grave na região.