Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Identificação, caracterização foliar e fisiologia de *Conyza spp* resistente a
herbicidas

Luisa Carolina Baccin

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2020

Luisa Carolina Baccin
Engenheira Agrônoma

Identificação, caracterização foliar e fisiologia de *Conyza spp.* resistente a herbicidas
Versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011.

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO VICTORIA FILHO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Baccin, Luisa Carolina

Identificação, caracterização foliar e fisiologia de *Conyza spp.* resistente a herbicidas / Luisa Carolina Baccin. - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - Piracicaba, 2020.

57 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Buva 2. Superfície foliar 3. 2,4-D 4. Glyphosate 5. Rápida necrose l.
Título

À minha mãe, por todo apoio conferido durante este período, dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos professores que orientaram minha trajetória até o presente momento: professor Ricardo Victoria Filho pela oportunidade e pela excelente orientação, professor Alfredo Junior Paiola Albrecht pela excelente supervisão e pela viabilização de grande parte do presente estudo, professor Leandro Paiola Albrecht pela orientação e professor Rafael M. Pedroso pelo acompanhamento em projetos durante o período de mestrado.

A todos demais professores da ESALQ e da UFPR que contribuíram para formação como Engenheira Agrônoma e Mestre em Ciências.

Aos técnicos de laboratório e funcionários da ESALQ que auxiliaram durante a condução dos experimentos.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Aos colegas do Pro Hort, colegas do programa de pós-graduação e aos colegas da equipe Supra Pesquisa.

A minha família e aos amigos pelo suporte. Ao Muriel pelo apoio incondicional em todos os momentos.

A todos que de alguma forma contribuíram para obtenção deste título.

Obrigada.

“You can teach a student a lesson for a day; but if you can teach him to learn by creating curiosity, he will continue the learning process as long as he lives.”

– **Clay P. Bedford**

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
Referências	11
2 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FOLIAR DE BIÓTIPOS DE <i>Conyza bonariensis</i> (L.) Cronquist RESISTENTE AO GLYPHOSATE.....	15
Resumo.....	15
Abstract	15
2.1 Introdução.....	16
2.2 Material e métodos	18
2.2.1 Seleção dos biótipos coletados à campo	18
2.2.2 Curvas de dose resposta ao glyphosate	21
2.2.3 Caracterização da superfície epicuticular	22
2.3 Resultados e Discussão	23
2.4 Conclusões.....	30
Referências	30
3 RESISTÊNCIA MÚLTIPLA À HERBICIDAS EM <i>Conyza sumatrensis</i> : ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS	35
Resumo.....	35
Abstract	35
3.1 Introdução.....	36
3.2 Material e métodos	39
3.2.1 Obtenção dos biótipos	39
3.2.2 Análise de morfologia foliar	39
3.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão	40
3.2.4 Análises de indicadores de estresse oxidativo	41
3.2.5 Análise estatística.....	42
3.3 Resultados e Discussão	42
3.4 Conclusões.....	53
Referências	54
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57

RESUMO

Identificação, caracterização foliar e fisiologia de *Conyza spp.* resistente a herbicidas

A buva (*Conyza spp.*) é uma das principais plantas daninhas no sistemas de produção de grãos atualmente. A grande similaridade entre as espécies, a possibilidade de hibridação e a dificuldade de controle devido a seleção de biótipos resistentes tem tornado o manejo desta planta daninha um desafio nas culturas de soja, milho trigo além de outros cereais e várias outras culturas. Há relato de resistência de biótipos ao glyphosate desde 2004 no Brasil e desde então sua área de distribuição tem aumentado. Posteriormente foram relatados casos de resistência múltipla a mais de um mecanismo de ação de herbicidas, sendo recentemente identificados biótipos resistentes ao glyphosate, chlorimuron e ao paraquat, apresentando também resposta de rápida necrose após aplicação de 2,4-D. Objetivou-se avaliar em biótipos de *Conyza bonariensis* e *Conyza sumatrensis* características da superfície foliar em biótipos suscetível (S) e resistente (R) ao glyphosate, previamente selecionados após ensaio de curva dose-resposta, visando quantificar estômatos e tricomas e classificar as plantas quanto sua adaptação fisiológica e possível barreira a penetração de herbicidas nas folhas em biótipos resistentes. Em *Conyza sumatrensis* também objetivou-se identificar por meio de microscopia eletrônica de transmissão a resposta à nível celular de biótipos S e R ao paraquat 0 e 8 horas após aplicação (HAA) e biótipos que apresentam comportamento de rápida necrose ao herbicida 2,4-D 0, 1 e 6 HAA. Análises bioquímicas também foram realizadas visando quantificar a formação de indicadores de estresse oxidativo através da quantificação de malonaldeído (MDA) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na resposta dos biótipos suscetível e com rápida necrose. Os dados foram submetidos à análise de variância e empregou-se análise de regressão para os tempos de coleta (horas após aplicação do herbicida). Observou-se que em *C. bonariensis* o fator de resistência ao glyphosate foi de 31,49 e que houve alteração na densidade estomática e de tricomas entre os biótipos, podendo ser um mecanismo relacionado a redução da eficácia do herbicida na planta. Em *C. sumatrensis* a avaliação das imagens obtidas via microscopia de transmissão confirma que em biótipos resistentes ao paraquat o herbicida não chega ao local de ação, sendo possível observar os cloroplastos mantendo sua estrutura em biótipo resistente e colapso das membranas e extravasamento do conteúdo do estroma no biótipo suscetível após 8h da aplicação. Em relação à resposta de rápida necrose de 2,4-D as plantas apresentaram colapso das células do mesófilo 6 HAA nos biótipos que apresentam rápida necrose, enquanto o biótipo suscetível mantém sua estrutura celular. Em relação ao estresse oxidativo e às enzimas antioxidantes observa-se que o biótipo S apresenta naturalmente maior concentração de H_2O_2 (antes da aplicação) em relação ao biótipo R. Quanto à peroxidação lipídica o biótipo R têm maior acúmulo de MDA após aplicação, devido à rápida necrose. Estas características demonstram que o biótipo com resposta de rápida necrose é mais responsivo a aplicação do herbicida. Análises de enzimas do sistema antioxidante destas plantas podem auxiliar na elucidação deste mecanismo.

Palavras-chave: Buva, Superfície foliar, 2,4-D, Glyphosate, Rápida necrose

ABSTRACT

Identification, leaf characterization and physiology of resistant *Conyza* spp.

Fleabane (*Conyza* spp.) is one of the main weeds in grain production systems. The similarity between the species, possibility of hybridization and the difficulty of control due to selection of resistant biotypes has made the management of this weed a challenge in soybean, wheat maize other cereals and cultures. Glyphosate resistant biotypes has been reported since 2004 in Brazil and since then its distribution area has increased. Few years after this reports, cases of multiple resistance to more than one herbicide mechanism of action were reported, and biotypes resistant to glyphosate, chlorimuron and paraquat were recently identified, also presenting a rapid necrosis response after 2,4-D application. The objective of this study was to evaluate in *Conyza bonariensis* and *Conyza sumatrensis* leaf surface characteristics in susceptible (S) and glyphosate resistant (R) biotypes, previously selected after dose-response curve assay, aiming to quantify stomata and trichomes and classify plants as its physiological adaptation and possible barrier to herbicide penetration in resistant biotypes. In *Conyza sumatrensis*, the objective was to identify, by transmission electron microscopy, the cellular response of S and R to paraquat application at 0 and 8 hours after application (HAA) and biotypes that exhibit rapid necrosis to 2,4- D at 0, 1 and 6 HAA. Biochemical analyzes were also performed to quantify the formation of oxidative stress indicators (MDA and H₂O₂) in the response of susceptible and rapid necrosis biotypes. Data were subjected to analysis of variance and regression analysis was used for hours after herbicide application. It was observed that in *C. bonariensis* the glyphosate resistance factor was 31.49 and that there was a change in stomatal and trichome density between biotypes, which may be considered a mechanism that reduces herbicide penetration in the plant. In *C. sumatrensis* the evaluation of the images obtained by transmission microscopy confirms that in paraquat resistant biotypes the herbicide does not reach the action site, being possible to observe the chloroplasts maintaining their structure in resistant biotype and membrane collapse and extravasation of stromal content into susceptible biotype after 8h of application. Regarding the rapid necrosis response of 2,4-D the plants presented at 6 HAA mesophyll cell collapse in the biotypes that present rapid necrosis response, while the susceptible biotype maintains its cellular structure. To the evaluation of oxidative stress and antioxidant enzymes, it is observed that S biotype presents higher concentration of H₂O₂ compared to biotype R. Lipid peroxidation in R biotype has higher accumulation of MDA after application due to rapid necrosis. These characteristics demonstrate that the biotype with fast necrosis response is more responsive to herbicide application. Enzyme analyzes of the antioxidant system of these plants may help in elucidating this mechanism.

Keywords: Fleabane, Leaf surface, 2,4-D, Glyphosate, Rapid necrosis

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais sistemas de produção de grãos atualmente no país trata-se da sucessão de cultivos de soja e milho, podendo haver ainda rotação com outras culturas, como algodão, trigo, aveia ou integração com pecuária. Nestes sistemas de cultivo, o manejo das plantas daninhas tem grande importância para obtenção de altas produtividades. Quando este controle não é bem realizado e há escapes de plantas infestantes, ocorre a competição com a cultura de interesse por recursos do ambiente (espaço, luz, água e nutrientes) e em alguns casos pode haver ainda interferência devido alelopatia (Vargas & Roman, 2006).

As plantas daninhas possuem uma característica que torna a competição um grave fator na perda de produtividade. Segundo Pitelli (1985), são adaptadas ao ambiente, diferentemente das culturas que são selecionadas para obtenção de maiores produtividades e para escolha de características desejáveis. Estas plantas vêm se desenvolvendo no ambiente e sofrendo adaptações que as tornam cada vez mais competitivas. Além do dano causado pela competição, refletido em perda de produtividade também ocorre a redução da qualidade de grãos, desuniformidade na maturação, dificuldade durante as operações de colheita e tratam-se de hospedeiras entre as safras para pragas e doenças (Agostinetto et al., 2008).

O manejo das plantas daninhas em locais de produção agrícola deve ser realizado por meio de integração de métodos de controle. Existem, atualmente, várias ferramentas as quais podem ser empregadas para seu controle eficaz, podendo ser citados: manejo preventivo, cultural, mecânico, químico e biológico, sendo este último pouco relevante nesta área (Oliveira JR et al., 2011).

A base para o sucesso no controle das plantas daninhas consiste na integração dos métodos, através da utilização do manejo integrado. Atualmente o controle químico é uma das ferramentas mais importantes e o método mais adotado na realização do controle. Porém, para que se obtenha sucesso é fundamental conhecer as espécies presentes na área de cultivo e realizar um posicionamento correto das moléculas de herbicidas visando realizar o manejo de forma sustentável e econômica (Victória Filho, 2003).

O conhecimento do sistema de produção adotado permite um bom planejamento de safra, visando estabelecer as culturas eliminando todas as possibilidades de perda de produção. No Brasil, um sistema de produção de grãos estabelecido e intensamente utilizado consiste na sucessão de plantio da cultura da soja seguida da cultura do milho segunda safra. Dos 63,1 milhões de hectares cultivados com grãos na última safra (2018/2019), 36,1 milhões

de hectares foram cultivados com soja, 5,1 milhões de ha com milho na safra e 11,6 milhões de hectares com milho em segunda safra, após a soja (CONAB, 2019).

Neste sistema de produção, algumas plantas daninhas em especial são mais problemáticas, exigindo uma atenção especial para posicionamento de manejo. Atualmente, aquelas que apresentam resistência ou tolerância ao glyphosate e resistência múltipla à herbicidas são as plantas que exigem um posicionamento muito técnico visando um manejo bem-sucedido para não haver competição com as culturas.

O avanço no sistema plantio direto representou um grande avanço em relação a produção agrícola no Brasil. Com este novo conceito de manejo das áreas produtoras de grãos o preparo de solo foi substituído pelo mínimo revolvimento, apenas na linha de semeadura, mantendo a cobertura de solo com palhada e evitando perdas por erosão. Esta mudança no sistema de cultivo trouxe muitos benefícios e promoveu alteração na composição de plantas daninhas presentes nas áreas (Gomes & Christoffoleti, 2008).

Dentre estas, destaca-se a buva (*Conyza spp.*), espécie com grande capacidade de formação e dispersão de sementes, fotoblásticas positivas e que necessitam pouca profundidade de semeadura para germinação. A ausência do revolvimento do solo por meio de aração e gradagens passou a não realizar mais o enterro das sementes, que quando expostas à luz e água germinam facilmente (Nandula et al. 2006; Lamego & Vidal, 2008).

Após a introdução da tecnologia RR, o herbicida glyphosate passou a ser amplamente utilizado em soja e milho transgênicos, sucessivas vezes e por muito tempo o manejo passou a ser baseado apenas em um único produto, de um mecanismo de ação não seletivo, de amplo espectro e baixo custo (Vidal et al., 2007; Yamauti & Barroso, 2010).

A seleção de biótipos resistentes ocorreu de forma rápida, após poucos anos de liberação e uso da tecnologia RR houve relato de espécie resistente ao glyphosate. Nos Estados Unidos da América, três anos após o início da utilização do herbicida como única alternativa para controle pós emergente foi relatado o primeiro caso de *Conyza spp.* resistente ao glyphosate, em Delaware (Vangessel, 2001). No Brasil falhas de controle foram observadas nas safras 2004/2005 e 2005/2006 em áreas no Rio Grande do Sul (Vargas et al., 2007; Dan et al., 2013).

A pressão de seleção exercida pelo herbicida é um dos principais fatores relacionados à evolução dos casos de resistência em plantas daninhas, porém podem ser citados também a frequência inicial do genoma resistente, especificidade do herbicida, modo de herança genética da espécie, taxa de cruzamento e transferência de alelos resistentes, intensidade de infestação e características do banco de sementes (Inoue & Oliveira JR, 2011).

A recomendação de manejo em soja baseia-se na aplicação de herbicidas na dessecação pré-plantio, aplicação em pós inicial durante o período crítico de prevenção à interferência, além da recomendação de dessecação da cultura, visando adiantar e uniformizar a colheita (Albrecht et al., 2019).

Deste modo um programa de manejo de plantas daninhas em soja muito utilizado consiste na dessecação pré-plantio utilizando glyphosate e 2,4-D ou chlorimuron, glyphosate e/ou chlorimuron após emergência da soja para o manejo de dicotiledôneas dentro da cultura e posteriormente, ao final do ciclo a dessecação com paraquat. Após alguns anos de utilização destas combinações, devido à alta pressão de seleção exercida pela repetição dos mesmos herbicidas, na mesma cultura, houve a seleção de biótipos apresentando resistência múltipla aos herbicidas (Albrecht et al. 2018; Albrecht et al. 2019).

Existem atualmente 16 casos de resistência múltipla a herbicidas no Brasil (Heap, 2019). A confirmação da presença de biótipos com resistência múltipla dificulta o manejo pois ocorre a perda de uma ferramenta de manejo, muito utilizada no controle. Recentemente foram relados casos de resistência múltipla a herbicidas: *Conyza sumatrensis* resistente glyphosate e chlorimuron (Santos et al., 2014), *Conyza sumatrensis* resistente à paraquat, chlorimuron e glyphosate no Brasil (Albrecht et al., 2018) e no Paraguai (Albrecht et al., 2019) e *Conyza sumatrensis* resistente à glyphosate, paraquat, 2,4-D e saflufenacil e diuron (Pinho et al., 2019).

O presente estudo objetivou identificar por meio de ensaio de curva dose-resposta biótipos de *Conyza spp.* resistentes e suscetíveis a herbicidas e avaliar possíveis mecanismos de resistência através de estudos de caracterização de superfície epicuticular, avaliação a nível celular empregando microscopia eletrônica de transmissão e a avaliação de indicadores de estresse oxidativo e de enzimas do sistema antioxidante em plantas.

Referências

- AGOSTINETTO, D.; RIGOLI, R.P.; SCHAEGLER, C.E.; TIRONI, S.P.; SANTOS, L.S. Período crítico de competição de plantas daninhas com a cultura do trigo. **Planta Daninha**, v. 26, n. 2, p. 271-278, 2008.
- ALBRECHT, A. J. P.; PIVETTA, L. A.; ALBRECHT, L. P.; SILVA, A. F. M.; PIRES, A.; THOMAZINI, G.; LORENZETTI, J. B.; DANILUSSI, M. T. Y. Buva resistente a herbicidas em el Paraguay. **Informativo Supra Pesquisa**. Ano II, n.2. 2019.
- ALBRECHT, L. P.; ALBRECHT, A.J.P.; PELLIZZARO, E. C.; SILVA, A. F. M. Dessecação pré-semeadura: para uma boa lavoura e contra as plantas daninhas. **Revista Campo & Negócios**, v. X, p. 22-24, 2019.

ALBRECHT, A. J. P.; ALBRECHT, L. P.; PIRES, A.; THOMAZINI, G.; LORENZETTI, J. B.; DANILUSSI, M. T. Y. Multiple resistant of Sumatran Fleabane in Paraguay. In: **Weeds International survey of herbicide-resistant weeds**. 2018.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 6 - Safra 2018/19 - Décimo segundo levantamento, Brasília, p. 1-126, 2019.

DAN, H. A.; BRAZ, G. B. P.; BIFFE, D. F.; ALONSO, D. G.; RAIMONDI, M. A. Histórico da infestação de buva resistente a herbicidas no mundo e no Brasil. In: CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA JR, R. S.; OLIVEIRA NETO, A. M.; BLAINSKI, E. **Buva: fundamentos e recomendações para manejo**. Curitiba: Omnipax, 2013.

GOMES JR., F. G.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Biologia e manejo de plantas daninhas em áreas de plantio direto. **Revista Planta Daninha**, v. 26, n. 4, p. 789-798, 2008.

HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. 2019.

INOUE, M.H.; OLIVEIRA JUNIOR, R.S. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. In: OLIVEIRA JUNIOR, R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. (Eds.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, p. 193-214, 2011

LAMEGO, F. P.; VIDAL, R. A. Resistance to glyphosate in *Conyza bonariensis* and *Conyza canadensis* biotypes in Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Planta Daninha**, v. 26, n. 2, p. 467-471, 2008.

NANDULA, V. K. et al. Factors affecting germination of horseweed (*Conyza canadensis*). **Weed Science**, v. 54, n. 5, p. 898-902, 2006.

OLIVEIRA JR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, p. 1-36, 2011.

PINHO, C. F.; LEAL, J. F. L.; SOUZA, A. S.; OLIVEIRA, G. F. P. B.; OLIVEIRA, C.; LANGARO, A. C.; MACHADO, A. F. L.; CHRISTOFFOLETI, P.; ZOBIOLE, L. H. S. First evidence of multiple resistance of Sumatran Fleabane (*Conyza sumatrensis* (Retz.) E.Walker) to five- mode-of-action herbicides. **Australian Journal of Crop Science**, v. 13, p. 1688-1697, 2019.

PITELLI, R. A. Interferência de plantas daninhas em culturas agrícolas. **Informativo Agropecuário**, v. 11, n. 129, p. 16-27, 1985.

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

VANGESSEL, M. J. Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. **Weed Science**, v. 49, n. 6, p. 703-705, 2001.

VARGAS, L.; BIANCHI, M. A.; RIZZARDI, M. A.; AGOSTINETTO, D.; DAL MAGRO, T. Buva (*Conyza bonariensis*) resistente ao glyphosate na região sul do Brasil. **Embrapa Trigo** - Artigo em periódico indexado (ALICE). 2007.

VARGAS, L.; ROMAN, E. Manejo e controle de plantas daninhas na cultura de soja. **Embrapa Trigo** – Documentos (INFOTECA-E). 2006.

VICTÓRIA FILHO, R. Estratégias de manejo de plantas daninhas. In: ZAMBOLIN, L.; CONCEIÇÃO, M. L.; SANTIAGO, T. **O que os engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários**, Viçosa: UFV, 2003. p. 317- 375.

VIDAL, R. A. et al. Glyphosate resistant biotypes of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.) and its risk analysis on glyphosate-tolerant soybeans. **Journal of Food Agriculture and Environment**, v. 5, n. 2, p. 265-269, 2007.

YAMAUTI, M. S.; BARROSO, A. A. M.; DE SOUZA, M. C.; ALVES, P. L. D. C. A. Controle químico de biótipos de buva (*Conyza canadensis* e *Conyza bonariensis*) resistentes ao glyphosate. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 3, p. 495-500, 2010.

2 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FOLIAR DE BIÓTIPOS DE *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist RESISTENTE AO GLYPHOSATE

Resumo

A seleção de biótipos resistentes à herbicidas é atualmente o maior desafio no manejo de plantas daninhas nos sistemas de cultivo no Brasil. Após a introdução da tecnologia Roundup Ready e a intensa utilização de glyphosate, biótipos de buva resistentes ao herbicida (*C. bonariensis*, *C. sumatrensis* e *C. canadensis*) foram relatados em vários ambientes de produção e a presença dessas plantas daninhas de difícil controle aumenta a complexidade do manejo das culturas. Algumas características morfológicas da superfície foliar destas plantas podem influenciar o desempenho dos herbicidas, desta forma objetivou-se identificar, entre 36 biótipos coletados em diferentes localidades, biótipos resistentes e suscetíveis ao glyphosate. Após a identificação, (R) e (S) foram submetidos a ensaios de curva dose resposta, para caracterizar o nível de susceptibilidade dos biótipos. Outro experimento objetivou avaliar a superfície foliar de *Conyza bonariensis* (R) e (S) em dois estádios de desenvolvimento. Foram realizadas análises histológicas e visualizadas no microscópio eletrônico de varredura, visando caracterizar a morfologia e avaliar as estruturas anatômicas de cada espécie que possuem potencial efeito de redução da eficácia do herbicida. Avaliou-se densidade estomática e densidade de tricomas. O “screening” das populações coletadas confirmou três biótipos suscetíveis ao glyphosate, coletados em Piracicaba – SP e outros 33 que não obtiveram controle eficaz após aplicação do herbicida. Análises de superfície foliar indicam que a espécie apresenta folhas com característica anfiestomática e presença de tricomas tectores. Observou-se fator de resistência ao glyphosate de 31,49. O biótipo (S) apresenta redução do número de tricomas e maior densidade estomática (mm²) enquanto em (R) há maior número de tricomas e menor densidade estomática, características que podem ser relacionadas à redução da eficácia do herbicida no biótipo resistente.

Palavras-chave: Buva, Microscopia eletrônica de varredura, Resistência de plantas daninhas

Abstract

Herbicide resistant is currently the biggest challenge in weed management in agricultural systems in Brazil. Following the introduction of Roundup Ready technology and the intensive use of glyphosate, herbicide resistant (*C. bonariensis*, *C. sumatrensis*, and *C. canadensis*) biotypes has been reported in production environments and the presence of these weeds increases the complexity of crop management. Some morphological characteristics of the leaf surface of these plants may influence the herbicide performance. Thus, it was aimed to identify, among 36 biotypes collected in different localities, glyphosate resistant and susceptible biotypes. After identification, (R) and (S) were subjected to dose response curve assays to

characterize the susceptibility level of biotypes. Another experiment aimed to evaluate the leaf surface of *Conyza bonariensis* (R) and (S) at two developmental stages. Histological analyzes were performed and visualized in the scanning electron microscope, aiming to characterize the morphology and evaluate the anatomical structures of each species that have potential herbicide efficiency reduction effect. Stomatic density and trichome density were evaluated. The screening of the collected populations confirmed three glyphosate susceptible biotypes collected in Piracicaba - SP and 33 others that did not obtain effective control after herbicide application. Analysis of leaf surface indicates that the species has leaves with amphistomatic characteristics and the presence of trichomes. A glyphosate resistance factor of 31.49 was observed. The biotype (S) shows a reduction in the number of trichomes and a higher stomatal density (mm²) while in (R) there is a greater number of trichomes and a lower stomatal density, characteristics that may be related to the reduction of the herbicide effectiveness in the resistant biotype.

Keywords: Hairy-fleabane, Electron microscope of scanning, Weed resistance.

2.1 Introdução

Atualmente uma das plantas daninhas de maior importância no cenário agrícola é conhecida como “buva” ou “voadeira” e encontra-se infestando diversas culturas agrícolas, amplamente distribuída nas regiões do Brasil. Tratam-se de espécies do gênero *Conyza* que possuem grande similaridade e possibilidade de hibridação entre as espécies (Marochio et al., 2017), o que dificulta sua identificação no campo, além de ser frequente a presença das três espécies (*C. bonariensis*, *C. sumatrensis* e *C. canadensis*) o que causa confusão na diferenciação das mesmas (Lazaroto et al., 2008).

Tratam-se de um gênero disperso pelo mundo, sendo encontrado em locais de zona subtropical e clima temperado. Como uma característica comum às plantas daninhas em geral, são bem adaptadas aos ambientes onde se desenvolvem, sendo consideradas cosmopolitas (Green, 2010). Entre as espécies principais, conhecidas como buva, a competição e a redução de rendimento da cultura variam em função da identificação da espécie. Segundo Ponsa & Picapietra (2015) uma planta de *C. bonariensis* por metro quadrado reduz até 20% a produção de soja, enquanto para *C. sumatrensis* o mesmo dano é atingido quando se tem 4 plantas m².

Quando há seleção de plantas daninhas resistentes nas áreas de cultivo o manejo se torna mais caro e complexo. O custo da resistência de plantas daninhas à herbicidas está relacionado principalmente à necessidade de uso de herbicidas alternativos e à limitação da produtividade da cultura devido a competição. O custo médio de controle em áreas contendo

plantas daninhas resistentes à herbicidas pode aumentar de 42 à 290% dependendo das espécies presentes no sistema de produção (Adegas et al., 2017).

No cenário de produção de grãos do Brasil, em especial para a cultura da soja, a influência da resistência de plantas daninhas pode ser dividida em algumas fases: primeiramente em 1993 até meados de 2000, quando as opções de manejo em pós emergência na cultura da soja limitavam-se a aplicação de herbicidas inibidores da ALS, que por sua vez foram utilizados intensamente, selecionando biótipos de plantas daninhas resistentes à estes produtos (Monqueiro et al., 2000). No mesmo período, os herbicidas inibidores da ACCase eram a ferramenta utilizada no manejo de monocotiledôneas, que após tanto tempo de uso também selecionou biótipos resistentes em diversas regiões do país (Christoffoleti & López-Ovejero, 2003).

O desenvolvimento da tecnologia Roundup Ready foi considerado a solução dos problemas, pois possibilitou a utilização de um único produto (glyphosate), de amplo espectro de ação e grande eficiência para o manejo de várias espécies resistentes (Albrecht et al, 2013; Ikeda, 2013). Por sua vez, o uso repetido do produto por vários anos também selecionou biótipos de plantas daninhas resistentes e surgiu então a segunda fase de resistência de plantas daninhas. Recentemente, a descoberta de biótipos que apresentam resistência múltipla a herbicidas, ou seja, plantas que apresenta dois ou mais mecanismos diferentes de resistência a vários produtos vem preocupando os produtores devido à complexidade de manejo nessas áreas (Zobiole et al., 2019; Christoffoleti & Nicolai, 2016; Albrecht et al., 2018; Albrecht et al., 2019).

A resistência de plantas daninhas é uma característica de ocorrência natural, relacionada a capacidade da planta de sobreviver após exposição a uma determinada dose de herbicida. São características que estão relacionadas a variabilidade genética natural da espécie (Weed Science, 1998).

Os mecanismos de resistência descritos até hoje dividem-se em: “target-site resistance” (TSR) e “non-target-site resistance” (NTSR), que são traduzidas como “resistência específica” e “não específica” ou metabólica. Entre os mecanismos gerais que podem elucidar o desenvolvimento de resistência pelas plantas daninhas temos: alteração no sítio de ação da molécula herbicida; amplificação genica; metabolização o detoxificação; absorção foliar e/ou translocação diferencial; sequestro ou compartimentalização do herbicida em organelas celulares. Plantas que apresentam algumas destas alterações passam a não ser controladas quando expostas ao herbicida (Borgato & Netto, 2016).

Em *Conyza spp.*, tem-se atualmente seis relatos de resistência das espécies de buva ao glyphosate no Brasil, sendo resistência simples e/ou múltipla. Entre os mecanismos já descritos para a espécie tem-se o sequestro ou compartimentalização do herbicida (Ge et al., 2019; 2010), atividade de enzimas antioxidantes (Piasecki et al., 2019), absorção/translocação diferencial, sendo observado acúmulo de glyphosate na folha tratada (Ferreira et al., 2008; Cardinali et al., 2008).

Os herbicidas aplicados em pós emergência podem penetrar às plantas através do contato com folhas, caules, flores e frutos, contudo as folhas representam o principal órgão responsável pela penetração de herbicidas nestas plantas daninhas. A morfologia das folhas influencia a quantidade do herbicida interceptado e retido, de forma que a sua anatomia é determinante para a facilidade de absorção destes produtos (Silva, 2000).

Além das estruturas anatômicas da folha, o estágio de desenvolvimento da planta também pode alterar a eficácia do herbicida, devido à diferença de partição de fotoassimilados, afetando a translocação. Preconiza-se em geral que as aplicações sejam realizadas em estádios iniciais de desenvolvimento para garantir eficiência de controle (Johnson & Hoverstad, 2002; Silva, 2002; Marques et al., 2012), uma vez que quando realizadas em estádios de desenvolvimento mais avançados, em plantas bem estabelecidas, a eficácia de controle é bastante reduzida.

Em algumas espécies de plantas daninhas estas estruturas anatômicas funcionam como barreira à penetração de herbicidas aplicados em pós emergência, desta forma objetivou-se selecionar biótipos de *Conyza sp.* resistente e suscetível ao glyphosate e avaliar a morfologia foliar buscando comparar a superfície entre os biótipos e relacionar com a redução da eficácia de controle do herbicida no biótipo resistente.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Seleção dos biótipos coletados à campo

Sementes de buva (*Conyza spp.*) foram coletadas em diferentes localidades no estado de São Paulo, identificadas, acondicionadas em sacos de papel e trazidas ao departamento de Produção Vegetal da ESALQ, Piracicaba - SP. Na Tabela 1 estão descritas as coordenadas do local de coleta de cada biótipo.

Os biótipos foram semeados em bandejas contendo substrato vegetal e transplantadas à vasos plásticos de 0,8L preenchidos com mistura de solo e substrato (1:1), devidamente e

igualmente adubados, com seis repetições de cada biótipo. Os vasos permaneceram em casa de vegetação, com temperatura média de 26°C e sob irrigação diária de 5mm, distribuídos ao longo do dia. Esta etapa de desenvolvimento do experimento teve por objetivo identificar dentre os biótipos a resistência ao glyphosate. Quando as plantas atingiram 4 à 6 folhas expandidas, foi realizada aplicação de glyphosate (Zapp Qi®) na dose de 0, 720 e 1140 g e. a. ha⁻¹, utilizando um pulverizador experimental pressurizado à CO₂, em condições de temperatura e umidade relativa do ar adequadas, com pressão constante de 2 bar, velocidade de 4 km/h. Utilizou-se os bicos Magnojet 110.02 AD, correspondendo à uma vazão de 200L ha⁻¹, posicionado à 0,5m acima do alvo.

As avaliações foram realizadas aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação (DAA). Após este período, selecionou-se entre os biótipos, aqueles que apresentaram resistência ao herbicida, com avaliação de controle considerada nenhum ou pobre, e os suscetíveis, controle considerado excelente, quando comparados à testemunha sem aplicação, pelo método de avaliação da Asociación Latinoamericana de Malezas (ALAM, 1974), detalhado na Tabela 2.

Tabela 1- Descrição do local de coleta dos biótipos de buva (*Conyza spp.*)

Amostra	Município	Estado	Data de coleta	Latitude	Longitude
1	Piracicaba	SP	01/08/2018	22°42'31.8"	47°37'42.8"
2	Piracicaba	SP	01/08/2018	22°42'30.5"	47°37'42.5"
3	Piracicaba	SP	03/08/2018	22°42'27.3"	47°37'40.5"
4	Piracicaba	SP	03/08/2018	22°42'28.6"	47°37'38.3"
5	Piracicaba	SP	08/08/2018	22°42'30.9"	47°37'40.9"
6	Piracicaba	SP	08/08/2018	22°42'53.1"	47°37'18.5"
7	Piracicaba	SP	08/08/2018	22°42'54.9"	47°37'07.2"
8	Piracicaba	SP	08/08/2018	22°42'49.4"	47°37'12.7"
9	Piracicaba	SP	01/08/2018	22°42'59.0"	47°37'04.1"
10	Piracicaba	SP	06/08/2018	22°43'04.4"	47°36'58.9"
11	Piracicaba	SP	06/08/2018	22°42'10.6"	47°37'54.1"
12	Piracicaba	SP	06/08/2018	22°42'04.5"	47°37'52.7"
13	Piracicaba	SP	06/08/2018	22°42'00.4"	47°37'57.1"
14	Piracicaba	SP	06/08/2018	22°41'58.5"	47°37'49.9"
15	Jaboticabal	SP	15/08/2018	21°11'03.3"	48°22'19.3"
16	Jaboticabal	SP	15/08/2018	21°11'10.7"	48°22'47.9"
17	Jaboticabal	SP	15/08/2018	21°11'15.5"	48°23'01.9"
18	Jaboticabal	SP	15/08/2018	21°11'11.8"	48°23'10.3"
19	Jaboticabal	SP	15/08/2018	21°10'33.1"	48°23'00.7"
20	Jaboticabal	SP	15/08/2018	21°10'28.7"	48°22'40.7"
21	Jaboticabal	SP	15/08/2018	21°10'39.5"	48°22'14.8"
22	Jaboticabal	SP	16/08/2018	21°12'07.9"	48°24'48.7"
23	Jaboticabal	SP	16/08/2018	21°12'41.4"	48°24'34.7"
24	Jaboticabal	SP	16/08/2018	21°11'14.2"	48°22'47.1"
25	Matão	SP	16/08/2018	21°35'16.4"	48°18'45.2"
26	Matão	SP	16/08/2018	21°35'31.4"	48°19'44.7"
27	Matão	SP	16/08/2018	21°39'54.3"	48°21'25.9"
29	Tabatinga	SP	16/08/2018	21°44'31.3"	48°38'46.7"
30	Tabatinga	SP	16/08/2018	21°44'33.3"	48°39'05.6"
31	Tabatinga	SP	16/08/2018	21°44'25.8"	48°40'04.3"
32	Dois Córregos	SP	22/08/2018	22°18'24.7"	48°22'48.5"
33	Dois Córregos	SP	22/08/2018	22°18'28.4"	48°22'52.6"
34	Dois Córregos	SP	22/08/2018	22°18'24.4"	48°22'58.8"
35	Dois Córregos	SP	22/08/2018	22°18'16.1"	48°22'43.3"
36	Dois Córregos	SP	22/08/2018	22°18'17.3"	48°22'09.6"

Tabela 2 - Escala de avaliação visual de controle de plantas daninhas proposta pela Associação Latinoamericana de Malezas – ALAM.

Índice	% de controle	Descrição do nível de controle
1	91-100	Controle considerado excelente
2	81-90	Controle considerado muito bom
3	71-80	Controle considerado bom
4	61-70	Controle considerado suficiente
5	41-60	Controle considerado regular
6	0-40	Nenhum ou pobre

Fonte: Adaptado de ALAM (1974).

Após avaliação, foram selecionados dois biótipos para as avaliações em ensaio de curva dose resposta e caracterização da superfície epicuticular, um deles apresentando controle nenhum ou pobre e outro controle excelente.

2.2.2 Curvas de dose resposta ao glyphosate

Após a seleção dos biótipos suscetível (S) e resistente (R), o ensaio de curva dose resposta foi conduzido no Departamento de Produção Vegetal da ESALQ, Piracicaba - SP. Sementes foram obtidas das testemunhas da seleção inicial e semeadas em bandejas contendo substrato e posteriormente transplantadas para vasos plásticos de 0,8L contendo mistura de solo + substrato (1:1). O ensaio foi realizado em casa de vegetação sob mesmas condições descritas anteriormente e foi determinado o grau de susceptibilidade dos biótipos no estágio recomendado de aplicação (4 – 6 folhas expandidas).

Foram utilizadas as doses de glyphosate (Zapp Qi®): 0, 180, 360, 720, 1440, 2880, 5760, 11520 e 23040 g e.a. ha⁻¹, com quatro repetições por tratamento. Os tratamentos foram aplicados em câmara de aplicação experimental, com pressão de 2 bar, utilizando bicos de pulverização modelo Magnojet AD 110.02, posicionado à 50 cm do alvo.

Avaliou-se percentual de controle até os 28DAA, seguindo escala da ALAM (1974). A parte aérea das plantas foi coletada e acondicionada em estufa com circulação de ar à 65°C por 72 horas para aferição de matéria seca.

Os dados foram submetidos à análise de variância e quando significativos foram ajustados ao modelo de regressão não-linear (Streibig, 1988):

$$Y = \frac{a}{\left[1 + \left(\frac{x}{b}\right)^c\right]}$$

Onde y é a variável resposta (porcentagem de controle ou matéria seca), x é a dose do herbicida (g ha^{-1}), e a , b e c são os parâmetros estimados da equação, sendo a : a amplitude entre o ponto máximo e o mínimo da curva, b : a dose que promove 50% da resposta da variável e c : a declividade da curva em torno de b .

Para determinação da dose necessária para reduzir o crescimento da planta em 50, 80% (ED_{50} , ED_{80}) com base na avaliação visual utilizou-se software R.

2.2.3 Caracterização da superfície epicuticular

Para a caracterização da morfologia foliar, biótipos de buva (*Conyza bonariensis*) suscetíveis (S) e resistentes (R) ao glyphosate previamente testados em ensaio de curva dose resposta, foram semeados em vasos plásticos contendo uma mistura de solo + substrato (1:1) e mantidos em casa de vegetação com temperatura média de 26°C , umidade relativa de 60% e irrigação diária programada de 5 mm dia^{-1} , em delineamento inteiramente casualizado e houve rotação da posição dos vasos semanalmente para que não houvesse influência de outros fatores no desenvolvimento das plantas.

A análise histológica foi realizada via microscopia eletrônica de varredura nos biótipos (R) e (S) em dois estádios de desenvolvimento: plantas contendo quatro pares de folhas desenvolvidas (estádio 1) e oito a dez pares de folhas desenvolvidas (estádio 2), com três repetições para cada tratamento.

Após a coleta das folhas a serem amostradas, realizou-se cortes histológicos nas folhas em um área de 25mm^2 com auxílio de uma lâmina. As amostras foram preparadas segundo o protocolo Kitajima e Leite (1998), sendo fixadas em solução de Karnowsky, por 24 horas e em seguida lavadas em solução tampão Cacodilato 0,5 M. Depois de lavadas, foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) e secas no aparelho de ponto crítico, com uso de CO_2 líquido. As amostras foram preparadas em duplicata, sendo metade utilizada para visualização da superfície foliar

abaxial e adaxial e outra metade cortada para visualização do das estruturas no perfil das folhas com objetivo de quantificar espessura cuticular.

Ao final da secagem, montou-se “stubs” com os cortes histológicos das folhas e a superfície foi metalizada com uma fina película de ouro. A análise foi realizada em microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP, operando a 20 KV, e as imagens geradas foram micrografadas.

Foram quantificadas a densidade de estômatos e tricomas em ambas superfícies (1mm^2) e foram obtidas médias a partir das contagens dessas estruturas.

2.3 Resultados e Discussão

Os biótipos do “screening” inicial foram avaliados aos 28 DAA (Tabela 3) segundo escala proposta pela ALAM (1974). Apenas três, dos biótipos coletados em Piracicaba, no Departamento de Produção Vegetal da ESALQ, apresentaram susceptibilidade ao glyphosate. Os 33 biótipos restantes não apresentaram controle eficiente após a aplicação do herbicida, porém considerou-se controle 0 (nenhum) apenas para os biótipos que mantiveram crescimento em relação a testemunha.

O local de coleta escolhido visou selecionar plantas de áreas onde a utilização do herbicida não ocorre com frequência, visando evitar pressão de seleção de biótipos resistentes, porém sabe-se que a capacidade de dispersão das sementes provenientes de outras áreas é elevada (Shields et al. 2006; Moreira et al., 2007).

Os demais biótipos, coletados em áreas de cultivo de grãos, também localizadas na ESALQ, áreas de cultivo de cana, amendoim e beira de carreadores, localizadas em Jaboticabal, Matão e Tabatinga e biótipos coletados em área de produção de macadâmia em Dois Córregos apresentaram controle ineficiente. Tal fator pode ser relacionado, segundo López-Ovejero et al. (2008), à grande pressão de seleção exercida pelo glyphosate sob as populações de plantas daninhas.

Tabela 3 – Resultados do “screening” dos biótipos avaliados para resistência ao glyphosate. Piracicaba, 2019

Amostra	Município	Estado	Controle	Amostra	Município	Estado	Controle
1	Piracicaba	SP	0	19	Jaboticabal	SP	0
2	Piracicaba	SP	10	20	Jaboticabal	SP	0
3	Piracicaba	SP	15	21	Jaboticabal	SP	0
4	Piracicaba	SP	20	22	Jaboticabal	SP	10
5*	Piracicaba	SP	100 *	23	Jaboticabal	SP	15
6	Piracicaba	SP	100	24	Jaboticabal	SP	10
7	Piracicaba	SP	10	25	Matão	SP	30
8	Piracicaba	SP	100	26	Matão	SP	40
9*	Piracicaba	SP	0 *	27	Matão	SP	30
10	Piracicaba	SP	10	28	Matão	SP	30
11	Piracicaba	SP	15	29	Tabatinga	SP	40
12	Piracicaba	SP	20	30	Tabatinga	SP	40
13	Piracicaba	SP	20	31	Tabatinga	SP	30
14	Piracicaba	SP	15	32	Dois Córregos	SP	0
15	Jaboticabal	SP	5	33	Dois Córregos	SP	30
16	Jaboticabal	SP	0	34	Dois Córregos	SP	0
17	Jaboticabal	SP	0	35	Dois Córregos	SP	0
18	Jaboticabal	SP	0	36	Dois Córregos	SP	0

*Biótipos selecionados para ensaio de curva dose resposta.

Um biótipo que apresentou controle excelente (P5) e um biótipo com controle pobre (P9), ambos coletados em áreas do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ, com distância aproximada de 2km entre as áreas, foram selecionados para realização de ensaio de curva dose resposta. Os parâmetros obtidos através de regressão não-linear, para avaliação de controle visual, estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros da equação não linear log-logística^a referentes a controle visual aos 28 DAA ocasionada pelo herbicida glyphosate, em biótipos resistente e suscetível de *Conyza bonariensis*. Piracicaba - SP, 2019.

Parâmetros calculados ^a a partir de regressão não-linear referente ao controle visual						
Biótipo	a	b (ED ₅₀)	c	FR	ED ₈₀	FR
Resistente (P9)	142.737383	6115,211	-0.528851	31,49	84109,058	211,31
Suscetível (P5)	101.006674	194,155	-1.931108	-	398,032	-

^a: Equação $Y = a / [1 + (x/b)^c]$ Em que, “Y” representa percentual de controle expressado em relação a testemunha, “x” é a dose do herbicida, “a” “b” e “c” são os parâmetros estimados da equação, sendo “a” a amplitude entre o ponto máximo e o mínimo da curva, “b” a dose que promove 50% da resposta da variável e “c” a declividade da curva em torno de b. ED50 e 80: redução de controle em 50%, 80%, respectivamente. FR: fator de resistência relação entre as doses necessários para reduzir o controle do biótipo resistente e suscetível.

O ED₅₀ do biótipo resistente (P9) foi de 6115,211, enquanto o biótipo suscetível (P5) apresentou ED₅₀ de 194,155, apresentando o biótipo R um fator de resistência de 31,49. As curva dose resposta para controle visual aos 28 dias após aplicação do herbicida é representada na Figura 1.

Figura 1 – Controle visual aos 28 DAA ocasionada pelo herbicida glyphosate, em biótipos resistente e suscetível de *Conyza bonariensis*. Piracicaba – SP, 2019.

O primeiro caso de *Conyza bonariensis* resistente ao glyphosate foi relatado na África em 2003 (Heap, 2019), em 2004 relatou-se a resistência na Espanha e no ano seguinte no Brasil. Vargas et al. (2007) observaram a redução da fitointoxicação de plantas à campo após aplicação do herbicida, sendo que alguns biótipos eram devidamente controlados e outros não apresentavam sintomas de toxicidade. Ao realizar estudo em casa de vegetação os autores perceberam que o biótipo resistente, após aplicação de 5760 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate, apresentou nota visual de fitointoxicação máxima de 50%, enquanto o biótipo suscetível foi controlado com 360 g e.a. ha⁻¹ do herbicida.

Para biomassa seca residual, foi observado mesmo comportamento descrito anteriormente, restando, na maior dose avaliada (23040 g e.a. ha⁻¹) cerca de 20% de matéria seca residual (Figura 2). O resultado observado corrobora com dados de Moreira et al. (2007), em pesquisa avaliando resistência de *C. canadensis* e *C. bonariensis* ao glyphosate, que observou ser necessária uma dose muito maior de herbicida para reduzir a biomassa do biótipo resistente.

Figura 2 – Biomassa seca (%) aos 28 DAA ocasionada pelo herbicida glyphosate, em biótipos resistente e suscetível de *Conyza bonariensis*. Piracicaba – SP, 2019.

O fator de resistência observado caracteriza biótipos selecionados pela aplicação sucessiva e rotineira do herbicida, menos sensíveis a ação deste devido a adaptações fisiológicas e/ou morfológicas naturalmente desenvolvidas pelas plantas e tratando-se de característica genética das plantas, são herdáveis (Moreira et al., 2007; WSSA, 1998).

Os mecanismos envolvidos na resistência de plantas daninhas à herbicidas, citados anteriormente, podem estar ligados envolvidos com um ou mais fatores. Feng et al. (2004) observou em ensaios envolvendo mecanismo de resistência que a

translocação limitada, associada a compartimentalização do herbicida dentro da planta, podem ser mecanismos relacionados à resistência.

Segundo Ferreira et al. (2008), utilizando herbicida radiomarcado foi possível observar que houve maior retenção do herbicida glyphosate na folha tratada no biótipo resistente em relação ao biótipo suscetível, em *Conyza bonariensis*, sendo a translocação diferencial um mecanismo de resistência para os biótipos avaliados.

Na avaliação de superfície foliar de *Conyza bonariensis*, percebe-se que as folhas dos biótipos são anfiestomáticas (Figuras 3 e 5), apresentam tricomas tectores longos com a ponta afinada (Figura 3C e 4A), unicelulares e pluricelulares, os quais apresentam-se com alta densidade nas faces abaxial e adaxial (Figuras 3B e 3D).

Não foi possível realizar a diferenciação das estruturas no mesófilo empregando a microscopia de varredura, porém o detalhe da folha posicionada a vertical possibilita a melhor visualização dos tricomas e das células da superfície foliar (Figura 4).

Figura 3 - Caracterização foliar de *Conyza bonariensis* (R) - (A) Estômato (3400x); (B) Superfície adaxial (600x); (C) Tricomas tectores na superfície abaxial (400x); (D) Detalhe tricomas tectores e das células da superfície adaxial (500x).

Figura 4 - Caracterização foliar de *Conyza bonariensis* (R) - (A) Tricomas tectores (500x); (B) Detalhe do corte para visualização das estruturas do mesófilo (300x);

Figura 5 – Caracterização foliar de *Conyza bonariensis* (S) - (A) Tricoma tector pluricelular (1500x); (B) Detalhe superfície abaxial (100x); (C) Tricomas tectores na superfície adaxial (600x); (D) Detalhe estômatos e das células da superfície adaxial (500x).

Os tricomas são estruturas anatômicas com função de manter uma atmosfera saturada em vapor de água em torno da folha, visando a redução da transpiração, além de regular a temperatura e a reflexão da radiação solar que atinge a superfície das

plantas, porém estas estruturas presentes na superfície foliar podem interceptar gotas pulverizadas, impedindo que estas alcancem a epiderme propriamente dita e deste modo interferem na eficiência de ação dos herbicidas (Procópio et al., 2003; Larcher, 2000).

Em relação aos tricomas, temos que no biótipo (R) conforme há o aumento no estágio de desenvolvimento, o número de tricomas é aumentado, porém no biótipo (S) este número de tricomas é reduzido com o avanço no estágio de desenvolvimento (Tabela 5). Esta redução na superfície adaxial, superfície que mantém o maior contato com as gotas pulverizadas do herbicida, pode eventualmente ser uma barreira a absorção de alguns produtos, como já observado por outros autores (Procópio et al., 2003).

Os estômatos são anomocíticos, presentes em ambas as faces, devido a característica anfiestomática das folhas desta espécie. Observa-se que a face abaxial apresenta maior densidade estomática no biótipo resistente conforme há o aumento no estágio de desenvolvimento (Tabela 5). Alguns autores alegam que a maior presença de estômatos pode elevar a eficácia de produtos, porém sabe-se que a absorção desses não ocorre por essas estruturas e sim nos espaços intercelulares que apresentam essas estruturas (Greene & Bulkovac, 1974; Schonherr, 2006; Barroso et al., 2015).

Tabela 5 - Densidade de tricomas e densidade estomática (mm²) abaxial e adaxial em biótipo de *Conyza bonariensis* resistente (R) e suscetível (S) ao glyphosate em dois estádios de desenvolvimento (E1 – 4 folhas; E2 – 8/10 folhas).

Biótipo		Densidade tricomas (mm ²)		Densidade estomática (mm ²)	
		Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial
Resistente (P9)	E1	15,0	18,2	116,0	73,3
	E2	23,1	24,2	154,6	61,0
Suscetível (P5)	E1	13,2	13,8	156,6	120,0
	E2	7,7	9,3	90,5	103,7

Nas células-guarda dos estômatos, a presença da cutícula é reduzida, o que pode facilitar a absorção de herbicidas (Schonherr, 2006). As estruturas anatômicas da folha, aqui observadas, podem influenciar a deposição, retenção, absorção e translocação de soluções aplicadas sobre as folhas, funcionando como barreiras e assim associando-se a maior ou menor suscetibilidade ao controle com herbicidas.

A maior densidade estomática na face abaxial no biótipo resistente também pode ser relacionada à eficiência destas plantas, em relação ao biótipo suscetível, uma vez

que o aumento na densidade estomática na superfície abaxial permite às plantas uma maior condutância de gases e diminuir possíveis limitações de fotossíntese devido estresses ambientais (LIMA JR et al., 2006).

Diferenciação na morfologia foliar entre plantas suscetíveis e resistentes já são relatados na literatura em *Lolium multiflorum* (Galvan et al., 2012), *Digitaria insularis* (Barroso et al., 2015), *Chloris elata* (Placido, 2018) resistentes ao glyphosate e em *Conyza sumatrensis* (Pereira, 2019), resistente ao paraquat.

2.4 Conclusões

Foram observados predomínio de biótipos com controle ineficiente no screening realizado após aplicação de glyphosate. Observou-se fator de resistência de 31,49. Foi observado que em estágios mais avançados de desenvolvimento o biótipo (S) apresenta redução do número de tricomas e maior densidade estomática (mm²) enquanto (R) têm superfície com maior número de tricomas e menor densidade estomática na superfície adaxial. Supõe-se que estas características podem estar relacionadas à redução da eficácia do herbicida no biótipo resistente.

Referências

- ADEGAS, F. S.; GAZZIERO, D. L. P.; VARGAS, L.; KARAM, D.; DA SILVA, A. F.; AGOSTINETTO, D. Impacto econômico da resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil. In **Embrapa Soja-Resumo em anais de congresso** (ALICE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 2018.
- ALBRECHT, A. J. P.; ALBRECHT, L. P.; PIRES, A.; THOMAZINI, G.; LORENZETTI, J. B.; DANILUSSI, M. T. Y. Multiple resistant of Sumatran Fleabane in Paraguay. In: **Weeds International survey of herbicide-resistant weeds**. 2018.
- ALBRECHT, A. J. P.; PIVETTA, L. A.; ALBRECHT, L. P.; SILVA, A. F. M.; PIRES, A.; THOMAZINI, G.; LORENZETTI, J. B.; DANILUSSI, M. T. Y. Buva resistente a herbicidas em el Paraguay. **Informativo Supra Pesquisa**. Ano II, n.2. 2019.
- ALBRECHT, L. P.; ALBRECHT, A. J. P.; VICTORIA FILHO, R. Soja RR e o Glyphosate. In: ALBRECHT, L. P.; MISSIO, R. F. **Manejo de cultivos transgênicos**. p. 25 a 45, 2013.
- ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE MALEZAS. Recomendaciones sobre unificación de los sistemas de evaluación en ensayos de control de malezas. **ALAM**, Bogotá, v. 1, n. 1, p. 35-38, 1974.

BARROSO, A. A. M.; GALEANO, E.; ALBRECHT, A. J. P.; DOS REIS, F. C.; VICTORIA FILHO, R. Does sourgrass leaf anatomy influence glyphosate resistance? **Comunicata Scientiae**, v. 6, p. 445-453, 2015.

BORGATO, E. A; NETTO, A. G. Resistência múltipla e cruzada: casos no Brasil e mecanismos de resistência de plantas daninhas a herbicidas IN: CHRISTOFFOLETI, P. J.; NICOLAI, M. Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. 4 ed. Piracicaba; ESALQ. 2016.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. Principais aspectos da resistência de plantas daninhas ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 21, n. 3, p. 507-515, 2003.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; NICOLAI, M. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 4 ed. Piracicaba; ESALQ. 2016.

CARDINALI, V. C. B.; DIAS, A. C. R.; MUELLER, T. C.; ABERCROMBIE, L.; STEWART JR, C. N.; TORNISIELO, V. L.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Shikimate accumulation, glyphosate absorption and translocation in horseweed biotypes. **Planta Daninha**, v. 33, n.1, p. 109-118, 2015.

FERREIRA, E. A.; GALON, L.; ASPIAZÚ, I.; SILVA, A. A.; CONCENÇO, G.; SILVA, A. F.; VARGAS, L. Glyphosate translocation in hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) biotypes. **Planta Daninha**, v. 26, n. 3, p. 637-643, 2008.

FENG, P. C.; TRAN, M.; CHIU, T.; SAMMONS, R. D.; HECK, G. R.; CAJACOB, C. A. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. **Weed Science**, v. 52, n. 4, p. 498-505, 2004.

GALVAN, J. et al. Anatomia foliar de *Lolium multiflorum* sensível e resistente ao glyphosate. **Planta Daninha**, v. 30, n. 2, p. 407-413, 2012.

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

GE, X.; D'AVIGNON, D. A.; ACKERMAN, J. J.; DUNCAN, B.; SPAUR, M. B.; SAMMONS, R. D. Glyphosate-resistant horseweed made sensitive to glyphosate: low-temperature suppression of glyphosate vacuolar sequestration revealed by ³¹P NMR. **Pest management science**, v. 67, n.10, p. 1215-1221, 2011.

GREEN, T. D. **The ecology of fleabane (*Conyza* spp)**. Doctoral dissertation, Tesis doctoral. University of New England, Armidale, 2010.

GREENE, D. W.; BUKOVAC, M. J. Stomatal penetration: effect of surfactants and role in foliar absorption. **American Journal of Botany**, v. 61, p. 101-6, 1974.

IKEDA, F. S. Resistência de plantas daninhas em soja resistente ao glifosato. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 34, n. 276, 2013.

JOHNSON, G. A.; HOVERSTAD, T. R. Effect of row spacing and herbicide application timing on weed control and grain yield in corn (*Zea mays*). **Weed Technology**, v. 16, p. 548-553, 2002.

KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. 37 p. 1998.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. Rima artes e textos, São Carlos, 2000.

LAZAROTO, C. A.; FLECK, N. G.; VIDAL, R. A. Biology and ecophysiology of hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) and horseweed (*Conyza canadensis*). **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 852-860, 2008.

LÓPEZ OVEJERO, R. F.; CARVALHO, S. J. P.; VARGAS, L. **Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da ACCase (Grupo A)**. In: CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas, 3 ed, p. 50-61, 2008.

MARQUES, R. P.; RODELLA, R. A.; MARTINS, D. Características da anatomia foliar de espécies de braquiária e sua relação com a sensibilidade a herbicidas. **Planta Daninha**, v. 30, p. 809-816, 2012.

MAROCHIO, C. A.; BEVILAQUA, M. R. R.; TAKANO, H. K.; MANGOLIM, C. A.; OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; MACHADO, M. F. P. S. Genetic admixture in species of *Conyza* (Asteraceae) as revealed by microsatellite markers. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 39, n. 4, p. 437-445, 2017.

MONQUEIRO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; DIAS, C. T. S. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da ALS na cultura da soja (*Glycine max*). **Planta Daninha**, v. 18, n. 3, p. 419-425, 2000.

MOREIRA, M. S.; Nicolai, M.; Carvalho, S.J.P.; Christoffoleti, P.J. Resistência de *Conyza canadensis* e *C. bonariensis* ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p. 157-164, 2007.

PEREIRA, V. G. C. Caracterização da resistência de *Conyza sumatrensis* ao herbicida paraquat. Dissertação, Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”. Botucatu-SP, 2019.

PIASECKI, C.; CARVALHO, I. R.; CECHEIN, J.; GOULART, F. A.; MAIA, L. C. D.; AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. Oxidative stress and differential antioxidant enzyme activity in glyphosate-resistant and-sensitive hairy fleabane in response to glyphosate treatment. **Bragantia**, [online] In press, 2019.

PLACIDO, H. F. **Caracterização morfológica da superfície foliar de *Chloris elata* resistente ao glyphosate e manejo de capim-branco e capim-amargoso no período de entressafra no sistema de sucessão soja/milho**. Dissertação, Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, 2018.

PONSA, J. C.; PICAPIETRA, G. Efecto de dos especies de rama negra (*Conyza bonariensis* L. Cronquist y *Conyza sumatrensis* Retz E.Walker) en el rendimiento del cultivo de soja (*Glycine max* L. Merr). Libro de resúmenes del XXII Congreso de la ALAM – I Congreso de la ASACIM, 2015.

PROCÓPIO, S. O.; FERREIRA, E. A.; SILVA, E. A. M.; SILVA, A. A.; RUFINO, R. J. N.; SANTOS, J. B. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil. I - *Galinsoga parviflora*, *Crotalaria incana*, *Conyza bonariensis* e *Ipomoea cairica*. **Planta Daninha**, v. 21, p. 1-9, 2003.

SHIELDS, E. J.; DAUER, J. T.; VANGESSEL, M. J.; NEUMANN, G. Horseweed (*Conyza canadensis*) seed collected in the planetary boundary layer. **Weed Science**, v. 54, n. 6, p. 1063-1067, 2006.

SCHONHERR, J. Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 2.471- 2.491, 2006.

SILVA, A. A. **Controle de plantas daninhas**. Brasília: ABEAS, 2000. 260 p.

SILVA, A. A. **Biologia e Controle de Plantas Daninhas**. Brasília: ABEAS, 2002. 189 p.

STREIBIG, J.C. Herbicide bioassay. **Weed Research**, v. 28, p. 479-484, 1988.

VARGAS, L.; BIANCHI, M. A.; RIZZARDI, M. A.; AGOSTINETTO, D.; DAL MAGRO, T. Buva (*Conyza bonariensis*) resistente ao glyphosate na região sul do Brasil. **Embrapa Trigo** - Artigo em periódico indexado (ALICE). 2007.

WSSA - Weed Science Society of America. Resistance and tolerance definitions. **Weed technology**, v. 12, p. 789, 1998.

ZOBIOLE, L. H. S.; PEREIRA, V. G. C.; ALBRECHT, A. J. P.; RUBIN, R. S.; ADEGAS, F. S.; ALBRECHT, L. P. Paraquat Resistance of Sumatran Fleabane (*Conyza sumatrensis*). **Planta Daninha**, v. 37, 2019.

3 RESISTÊNCIA MÚLTIPLA À HERBICIDAS EM *Conyza sumatrensis*: ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS

Resumo

A resistência múltipla de biótipos de plantas daninhas aumenta a dificuldade no sistema de manejo a ser adotado devido à perda de mais de uma ferramenta utilizada no manejo químico. Biótipos de *C. sumatrensis* apresentando resistência múltipla a glyphosate, chlorimuron e paraquat tornam o manejo de plantas daninhas um desafio nas áreas de produção agrícola. Biótipos de buva com resistência múltipla aos herbicidas citados anteriormente também vem exibindo sintoma de rápida necrose após aplicação de 2,4-D em algumas regiões no Paraná. Objetivou-se avaliar características relacionadas a morfologia da superfície foliar de biótipos S e R de *C. sumatrensis*, além da resposta à nível celular e bioquímico dos biótipos após aplicação de paraquat e 2,4-D. Para caracterização foliar foram coletadas amostras de tecido em biótipos R e S e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura. A resposta a nível celular foi obtida através da análise em microscopia eletrônica de transmissão em biótipos S e R submetidos à aplicação de paraquat (400 g i. a. ha⁻¹) e 2,4-D (1005 g e. a. ha⁻¹). As imagens geradas foram micrografadas para a avaliação de alterações das estruturas celulares. Para compreensão do mecanismo de rápida necrose após aplicação do 2,4-D foram realizados ensaios para quantificação de estresse oxidativo através de análises de malonaldeído e peróxido de hidrogênio (MDA e H₂O₂) em biótipos R e S 0, 3, 6 e 24 horas após aplicação (HAA). Em relação à alteração das estruturas celulares observa-se que no biótipo R o paraquat não atinge o sítio de ação, mantendo a estrutura celular e os cloroplastos 8 HAA. Já o biótipo S apresenta extravasamento do conteúdo do estroma dos cloroplastos 8 HAA. Para o sintoma de rápida necrose de 2,4-D pode-se observar que o biótipo S não apresenta sintoma de aplicação de herbicida até 6HAA, diferentemente do biótipo R, no qual há o colapso das células e o rompimento da epiderme. Em relação ao acúmulo de peróxido de hidrogênio, o biótipo S apresenta naturalmente maior produção do que o biótipo R antes da aplicação do herbicida. A formação de MDA no biótipo R é maior devido à peroxidação lipídica desencadeada pelo efeito da rápida necrose.

Palavras-chave: Buva, Microscopia eletrônica de transmissão, Sistema antioxidante

Abstract

Multiple resistance of weed biotypes increases the difficulty in the management system to be adopted due to the loss of more than one tool used in chemical management. *C. sumatrensis* biotypes showing multiple resistance to glyphosate, chlorimuron and paraquat make weed management a challenge in agricultural production areas. Herbicide multiple resistance biotypes have also exhibited rapid necrosis symptoms after 2,4-D application in some locations of Paraná. The objective of this study was to evaluate characteristics related to leaf surface morphology of *C. sumatrensis* S and R biotypes, cellular and biochemical response of the biotypes after paraquat and 2,4-D application. For leaf characterization, tissue samples were

collected in R and S biotypes and visualized in a scanning electron microscope. Cellular response was obtained by transmission electron microscopy analysis of S and R biotypes submitted to paraquat (400 g a. i.ha⁻¹) and 2,4-D (1005 g a. e.ha⁻¹). Images were micrographed for the evaluation of alterations of the cellular structures. To understand the mechanism of rapid necrosis after 2,4-D application an assay were performed to quantify oxidative stress (MDA and H₂O₂) in R and S biotypes at 0, 3, 6 and 24 hours after application (HAA). Regarding the alteration of cellular structures, it is observed that in the R biotype paraquat does not reach the action site, maintaining the cellular structure and chloroplasts at 8HAA. The biotype S presents extravasation of the stromal content of chloroplasts. At 2,4-D rapid necrosis biotypes, it can be observed that S has no herbicide application symptoms up to 6HAA, unlike biotype R, in which there is cell collapse and epidermal disruption. Regarding the hydrogen peroxide accumulation, biotype S naturally presents higher production than biotype R before herbicide application. MDA formation in R biotype is higher due to lipid peroxidation triggered by the effect of rapid necrosis.

Keywords: Fleabane, Ultrastructure, Detoxify system

3.1 Introdução

O gênero *Conyza* agrupa cerca de 50 espécies e está presente em várias regiões da América e disperso inclusive em outros continentes. Destas espécies, três destacam-se por serem problemáticas em áreas de produção agrícola devido à difundida resistência à herbicidas, que dificulta seu controle: *C. canadensis*, *C. bonariensis* e *C. sumatrensis* (Sansom et al., 2013).

A diferenciação a nível de espécie é difícil devido à grande semelhança e a capacidade de hibridação entre as espécies. Técnicas genéticas são empregadas na identificação das espécies utilizando primers para locos microssatélites visando esclarecer a divergência molecular entre as espécies e avaliar os níveis de mistura genética entre as espécies no Brasil (Lamego et al., 2008; Marochio et al., 2017).

Estima-se que pode haver hibridação entre as três espécies de *Conyza* ocorrendo à campo no Brasil. Estudos apontam que a alta diversidade molecular em *C. sumatrensis* torna a espécie mais apta à colonizar áreas agrícolas e aumentar sua área de ocorrência, agravando seu potencial em competir com as culturas, disseminando biótipos resistentes (Marochio et al., 2017).

A espécie adaptou-se muito bem ao sistema de cultivo em plantio direto, onde o preparo de solo é mínimo e as sementes que são dispersas não são enterradas (Samson et al., 2013). Outro fator que possibilitou o aumento nas áreas infestadas está relacionada a biologia

da espécie: o maior fluxo de emergência é localizado nos meses de outono/inverno, havendo crescimento das plantas no período de pousio, associado ao manejo pouco eficaz na dessecação pré-plantio, havendo a rebrota em meio a cultura da soja, o que dificulta muito o manejo da espécie durante a safra (Constantin et al., 2013).

Deve-se optar preferencialmente pelo manejo em estádios iniciais de desenvolvimento, devido a maior opção de produtos e melhor eficácia destes tratamentos. Quando a operação de controle é realizada em estádios maiores de desenvolvimento a eficácia dos herbicidas diminui consideravelmente, podendo haver emissão de brotações laterais e consequentemente a rebrota destas plantas. As plantas provenientes de rebrota desenvolvem-se e produzem muitas sementes, as quais são facilmente dispersas no ambiente e irão garantir a continuidade do desenvolvimento da espécie na área (Neto et al., 2013; Santos et al., 2014).

O primeiro relato de resistência para *C. sumatrensis* foi em 1980, no Taiwan, ao herbicida Paraquat. No Brasil, em 2010 foi relatado primeiro caso de resistência, ao glyphosate. No ano seguinte houve relato de resistência à chlorimuron e no mesmo ano o primeiro relato de resistência múltipla para a espécie no Brasil: ao glyphosate e ao chlorimuron. Em 2017, outro relato de resistência múltipla, desta vez mais preocupante, sendo relatados biótipos de buva resistente ao glyphosate, chlorimuron e paraquat em áreas de produção de grãos. Posteriormente a equipe de pesquisa também constatou a presença de biótipos apresentando a mesma resistência múltipla em áreas agrícolas no Paraguai (Heap, 2019; Albrecht et al., 2019; Albrecht et al., 2018; Zobiole et al., 2019).

O mecanismo de resistência desta planta daninha vem sendo bastante estudado, visto que a ausência de controle proporcionada pelos herbicidas pode estar ligada a mais de um mecanismo de resistência. Pereira (2019) avaliou biótipos de *C. sumatrensis* resistentes e suscetíveis ao paraquat após aplicação e constatou que o sistema antioxidante das plantas resistentes (elevada atividade enzimática) está relacionado ao mecanismo de resistência ao paraquat.

Fuerst et al. (1985) e Vaughn & Fuerst (1985) também observaram que mesmo após a exposição durante 24 horas a solução contendo paraquat, nas plantas resistentes os cloroplastos permanecem com aparência normal, o que pode ser relacionado ao mecanismo de resistência: sequestro da molécula antes de atingir o sítio de ação na planta.

A resistência de buva à herbicidas inibidores da ALS podem ser atribuída a mutação no sítio de ação pela alteração de aminoácidos (Ser por Pro na posição P197S, Ala por Pro na posição P197A e Glu por Asp na posição D376E) (Zheng et al., 2011). Com essa alteração o

herbicida não consegue se ligar ao sítio de ligação na planta e consequentemente não há interrupção no metabolismo.

Outros estudos apontam como mecanismo de resistência de buva ao glyphosate a insensibilidade da enzima EPSPs (Kaspary et al., 2016), porém os autores citam que a resistência pode não estar atrelada somente à um mecanismo e que para seu entendimento são necessários estudos complementares. A translocação limitada também é um mecanismo de resistência ao glyphosate apontado em *Conyza* além de estudos de Piasecki et al. (2019), comprovando em *C. bonariensis* que as enzimas antioxidantes também estão relacionadas à resistência ao glyphosate.

Recentemente tem-se observado em condições de campo um sintoma incomum após aplicação de 2,4-D em biótipos de *C. sumatrensis*. Alguns biótipos apresentam uma resposta necrótica nas folhas, que se inicia com pequenas pontuações poucas horas após aplicação e evoluem para um sintoma de necrose semelhante à aplicação de produtos de contato em menos de 24 horas após a aplicação. O mesmo sintoma foi observado em plantas de *Ambrosia trifida* após aplicação de glyphosate nos Estados Unidos (Van Horn, 2018).

Sabe-se que a resposta necrótica está relacionada à aplicação em condição de luz e altas temperaturas, pois em biótipos previamente testados, quando aplicação é realizada em condição de luminosidade reduzida e temperatura amena o sintoma é menos intenso e de curta duração.

O herbicida 2,4-D é classificado como mimetizador de auxina e as moléculas enquadradas neste mecanismo mimetizam hormônios reguladores de crescimento, sendo denominados “hormonais” (Foloni, 2016). O 2,4-D atua na membrana plasmática, induzindo ativação proteica que codifica o acionamento de uma proteína G, a qual tem por função modular a ordenação do citoesqueleto e a disposição dos filamentos de actina e microtúbulos. Esta ação leva ao sintoma de epinastia das plantas, e ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs). Outra ação do herbicida ocorre no núcleo e induz a produção de etileno e ácido abscísico, também levando ao acúmulo de EROs, colapso da membrana plasmática, murchamento e morte dos tecidos. A evolução dos sintomas até a morte da planta pode levar dias ou até semanas (Figueiredo et al., 2016).

Trata-se do primeiro relato no Brasil de rápida necrose após aplicação de um herbicida sistêmico que demanda dias ou semanas para manifestação do sintoma de necrose nas plantas. Após a necrose, plantas em estágio de desenvolvimento mais avançado, em condições favoráveis, rebrotam e retomam o desenvolvimento.

Nos mesmos biótipos onde o sistema antioxidante age como mecanismo de resistência ao herbicida paraquat, o sintoma de rápida necrose de 2,4-D é observado. Deste modo objetivou-se neste estudo avaliar características morfológicas da superfície foliar em biótipos R e S de *C. sumatrensis* visando identificar modificações que conferem maior suscetibilidade aos herbicidas em biótipo S. Também buscou-se avaliar por meio de microscopia eletrônica de transmissão a resposta à nível celular de biótipo R e S após aplicação de Paraquat e 2,4-D além de análises bioquímicas para avaliação de indicadores de estresse oxidativo e enzimas do sistema antioxidante em biótipo R e S submetidos a aplicação de 2,4-D.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Obtenção dos biótipos

Biótipos de *Conyza sumatrensis* apresentando sinais de resistência múltipla a glyphosate, chlorimuron, paraquat e rápida necrose de 2,4-D foram coletados em área de produção de grãos no Oeste do Paraná (Tabela 6).

Tabela 6 - Descrição do local de coleta dos biótipos de buva (*Conyza sumatrensis*.)

Amostra	Município	Estado	Ano de coleta	Latitude	Longitude
1 ^{RM}	Assis Chateaubriand	PR	2018	-24,435	-53,6047222
2 ^{RM}	Assis Chateaubriand	PR	2018	-24,32666667	-53,51861111
3 ^{RM}	Assis Chateaubriand	PR	2018	-24,37055556	-53,61611111
4 ^{RM}	Toledo	PR	2018	-24,644214	-53,741908
5 [*]	Faxinal	PR	2018	-23,93722222	-51,22694444

^{RM} Biótipo apresentando resistência múltipla à glyphosate, chlorimuron e paraquat, além de sintoma de rápida necrose após aplicação de 2,4-D. ^{*} Biótipo suscetível aos herbicidas citados.

Experimentos de caracterização da resistência vem sendo conduzidos simultaneamente pela equipe de pesquisa na UFPR – Setor Palotina, já sendo confirmada resistência de *C. sumatrensis* ao paraquat (Zobiolo et al., 2019), resistência múltipla ao glyphosate, chlorimuron e paraquat no Brasil e no Paraguai (Albrecht et al., 2018; Albrecht et al., 2019).

3.2.2 Análise de morfologia foliar

A caracterização de superfície foliar foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura no laboratório de Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da ESALQ/USP. Tal caracterização foi realizada em dois estádios de

desenvolvimento nos biótipos de *Conyza sumatrensis* suscetíveis (S) e resistentes (R) ao glyphosate, chlorimuron e ao paraquat e que apresentam rápida necrose de 2,4-D.

As sementes foram germinadas em substrato comercial e as plântulas foram acondicionadas em vasos plásticos contendo uma mistura de solo + substrato (1:1) e mantidos em casa de vegetação com temperatura média de 26°C, umidade relativa de 60% e irrigação diária programada de 5 mm dia⁻¹, em delineamento inteiramente casualizado e houve rotação da posição dos vasos semanalmente para que não houvesse influência de outros fatores no desenvolvimento das plantas.

Os cortes histológicos nas folhas em um área de 25mm², foram realizados quando as plantas apresentavam quatro pares de folhas desenvolvidas (estádio 1) e oito a dez pares de folhas desenvolvidas (estádio 2), com três repetições para cada estágio. As amostras foram preparadas segundo o protocolo Kitajima e Leite (1998), sendo fixadas em solução de Karnovsky, por 24 horas e em seguida lavadas em solução tampão cacodilato 0,5 M. Depois de lavadas, foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) e secas no aparelho de ponto crítico, com uso de CO₂ líquido.

Ao final da secagem, montou-se “stubs” com os cortes histológicos das folhas e a superfície foi metalizada com uma fina película de ouro. A análise foi realizada em microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP, operando a 20 KV, e as imagens geradas foram micrografas.

Foram quantificadas a densidade de estômatos e tricomas nas superfícies abaxial e adaxial e comprimento do ostíolo. As médias foram obtidas a partir das contagens dessas estruturas.

3.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Sementes de biótipos de *C. sumatrensis* resistentes e suscetíveis foram germinados em substrato comercial e transplantados à vasos plásticos (0,8L) em casa de vegetação sob condições descritas anteriormente. Quando as plantas apresentavam 4 – 6 folhas desenvolvidas, biótipos resistente e suscetível foram submetidos à aplicação de Paraquat (400 g ha⁻¹) e 2,4-D (1005 g ha⁻¹), utilizando um pulverizador experimental pressurizado à CO₂, com pressão constante de 2 bar, velocidade de 4 km/h. Utilizou-se os bicos Magnojet 110.02 AD, correspondendo à uma vazão de 200L ha⁻¹, posicionado à 0,5m acima do alvo. A aplicação foi realizada às 11:00hs, ±25°C e condição de alta luminosidade.

As plantas foram julgadas resistentes ao paraquat pela capacidade de manter sua estrutura enquanto as suscetíveis foram rapidamente apresentando efeitos após aplicação do herbicida. Já em poucas horas após aplicação do 2,4-D as plantas que mantiveram sua estrutura e fisiologia sem demonstrar alterações visíveis foram julgadas suscetíveis enquanto plantas que após 1h de aplicação apresentavam pontuações necróticas foram consideradas “resistentes” devido à rápida necrose. Foram realizadas coletas após a aplicação dos herbicidas. Nos biótipos R e S que apresentam resistência à paraquat, foram coletadas amostras antes da aplicação e 8 horas após a aplicação. Nos biótipos com resposta de rápida necrose ao 2,4-D foram coletadas amostras antes da aplicação, com uma hora, três e seis horas após aplicação. Foram coletadas amostras de três plantas (R e S) por tratamento.

Cortes histológicos (5mm²) foram fixados em solução de Karnowsky por 24 horas, lavados duas vezes em tampão cacodilato 0,5 M e pós-fixado em 1% Cacodilato + tetróxido de ósmio por uma hora. As amostras foram lavadas com água destilada e coradas em acetato de uranila 1% (p / v) por 12 horas. Prosseguiu-se com a desidratação com acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) e incorporação em resina. Seções (cinza-prateadas) foram obtidos com ultramicrotomo Leica e coradas com citrato de chumbo aquoso antes da observação em microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM 1011. As imagens foram micrografadas para avaliação das estruturas celulares.

3.2.4 Análises de indicadores de estresse oxidativo

Após a aplicação de 2,4-D, folhas dos biótipos R e S foram coletadas para quantificação de indicadores de estresse oxidativo devido à rápida necrose (0, 3, 6, 24h após aplicação). O teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) foi empregado para determinação da peroxidação lipídica.

O teor de substâncias reativas ao ácido (TBARS) foi quantificado em espectrofotômetro como produto do processo de peroxidação de lipídios, com leituras a 535 e 600 nm. A peroxidação lipídica foi obtida pela quantificação do malonaldeído (MDA).

Utilizou-se 0,2 g de tecido vegetal, macerado em nitrogênio líquido e homogeneizado em 3 mL de TCA (0,1%) com 0,04g de polivinilpolipirrolidona (PVPP) (m/m). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos à 4°C. Do sobrenadante, 0,25 mL do foram adicionados a 1 ml de solução TCA + TBA e aquecido a 95°C por 30 minutos e em seguida acondicionado em banho de gelo. Após o resfriamento, o tubo foi centrifugado

novamente a 10.000 rpm por 10 minutos, seguido de leitura em espectrofotômetro a 535 e 600 nm. A concentração de MDA foi expressa em nM MDA.g⁻¹ matéria fresca (MF).

A quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ocorreu de acordo com o método descrito por Alexieva et al. (2001). A partir da mesma amostra utilizada para quantificação de MDA, retirou-se uma alíquota de 0,2 mL, adicionou-se 1 mL de solução contendo 0,8 ml de KI 1 mol L⁻¹ e 0,1 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹ pH 7,5. Essa mistura foi mantida no gelo e no escuro por uma hora, sendo realizada posteriormente a leitura em espectrofotômetro a 390 nm. A concentração de H₂O₂ foi expressa em mM.g⁻¹ MF.

3.2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando pacote Sisvar[®] e para os dados de quantificação de indicadores de estresse oxidativo foi aplicada regressão para o fator “horas após aplicação” (p≤0,05).

3.3 Resultados e Discussão

As superfícies abaxial e adaxial de *C. sumatrensis* (Figuras 6 - 7) se assemelham morfológicamente à *C. bonariensis*, sendo anfiestomática com presença de tricomas tectores longos, pluricelulares e tricomas unicelulares e estômatos anomocíticos, não apresentando células subsidiárias diferenciadas (Apezzato-DaGlória & Guerreiro, 2012).

Os dados de densidade estomática e de tricomas (mm²) estão descritos na Tabela 7. Em relação ao estágio de desenvolvimento observa-se que para o biótipo R ocorre redução na densidade de tricomas e estômatos da superfície abaxial conforme há o desenvolvimento do estágio 1 para estágio 2, aumento na densidade de tricomas e redução da densidade estomática na superfície adaxial.

Tabela 7 - Densidade de tricomas e densidade estomática (mm²) abaxial e adaxial em biótipo de *Conyza sumatrensis* resistente (R) e suscetível (S) em dois estádios de desenvolvimento (E1 – 4 folhas; E2 – 8/10 folhas).

Biótipo		Densidade tricomas (mm ²)		Densidade estomática (mm ²)	
		Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial
Resistencia múltipla	E1	17,09	12,22	182,4	140,55
	E2	15,13	17,16	148,61	132,22
Suscetível	E1	12,9	12,5	111,6	144,23
	E2	26,7	16,15	144,2	90,38

Figura 6- Caracterização foliar de *Conyza sumatrensis* - (A) Superfície adaxial, biótipo R, estágio 1 (900x); (B) Detalhe superfície adaxial, biótipo S, estágio 1 (900x); (C) Superfície abaxial (R-E1) (900x); (D) Superfície abaxial (S-E1) (900x).

Figura 7 - Caracterização foliar de *Conyza sumatrensis* - (A - C) Biótipo R – superfície adaxial e abaxial, estágio 2 (900x); (B - D) Biótipo S - superfície adaxial e abaxial, estágio 2 (900x).

Em ambos estádios de desenvolvimento o biótipo R apresenta maior densidade estomática abaxial em relação ao biótipo S (Figuras 8 e 9), característica observada por Pereira (2019), havendo redução de 38,8% na quantidade destas estruturas celulares na face abaxial das folhas no estágio 1 e de 3% no estágio 2. Para o primeiro estágio de desenvolvimento observa-se ainda maior densidade estomática na face adaxial em biótipo S, o que pode demonstrar uma adaptação em biótipos R visando controlar trocas gasosas e perda de água para o ambiente por meio da transpiração (Pillitteri et al., 2007; Irvine et al., 1998).

Já para o biótipo suscetível, ocorre aumento na quantidade de tricomas em ambas as faces foliares, aumento na densidade estomática na face abaxial e redução na face adaxial.

Figura 8 - Caracterização foliar de *Conyza sumatrensis* - (A) Detalhe estômatos biótipo R (2.000x); (B) Detalhe estômatos, biótipo S (2.000x).

Figura 9 - Caracterização foliar de *Conyza sumatrensis* - (A) Detalhe estômatos biótipo R, estágio 2 (2.000x); (B) Detalhe estômatos, biótipo S, estágio 2 (2.000x).

Em relação à quantidade de tricomas ambos os biótipos apresentam valores muito próximos, de forma que não é possível apontar a presença de tricomas como modo de retenção das gotas de pulverização e possível redução na absorção do herbicida. Como a condução de ambos biótipos ocorreu sob a mesma condição em ambiente protegido estas diferenças na densidade estomática dos biótipos podem permitir o aumento da condutância de gases e favorecer a fotossíntese em condições estressantes (Lima JR et al., 2006).

A visualização em microscopia eletrônica de transmissão de cortes histológicos em biótipos R e S submetidos a aplicação de paraquat permite a observação, à nível celular, do mecanismo de resistência descrito para *C. sumatrensis*. Observa-se detalhes das epidermes adaxial e abaxial e dos cloroplastos (Figura 10) antes da aplicação do herbicida.

Figura 10 – Microscopia eletrônica de transmissão da epiderme adaxial (A) e abaxial (B) e cloroplastos (C-D) de *Conyza sumatrensis* antes da aplicação do herbicida.

Após 8 horas da aplicação de paraquat é possível observar no biótipo R danos leves à epiderme foliar (Figura 11), porém ainda há organização celular devido à manutenção da parede da célula vegetal.

A manutenção da estrutura celular observada no biótipo R (8HAA) demonstra, a nível celular, o mecanismo de resistência avaliado por Pereira (2019), Vaughn & Fuerst (1985), Pölös et al. (1987) em *Conyza spp.* submetida à aplicação de paraquat. Nestes biótipos o dano que ocorre é menor devido à menor produção de EROs ou ação de enzimas do sistema antioxidante das plantas, permitindo ao biótipo R uma rápida resuperação após exposição ao herbicida, o que é fatal nos biótipos S.

Figura 11 – Microscopia eletrônica de transmissão 8HAA paraquat – Epiderme adaxial (A - B) e cloroplasto (C) em biótipo resistente de *C. sumatrensis*.

No biótipo suscetível após 8 horas da aplicação do herbicida nota-se colapso das células no interior do tecido vegetal, não sendo possível identificar as células isoladamente, como no biótipo R (Figura 12). Observa-se da mesma forma que no biótipo S ocorre o rompimento da membrana dos cloroplastos e extravasamento do conteúdo do estroma (Figura 13). A ação do paraquat em biótipos S na presença de luz ocorre de forma muito rápida, devido atuação no aparato fotossintético das plantas.

Figura 12 – Microscopia eletrônica de transmissão em biótipo S 8HAA de paraquat. Estrutura celular colapsada (A); Rompimento dos cloroplastos e extravasamento do conteúdo do estroma (B-C).

Figura 13 – Rompimento da membrana dos cloroplastos e extravasamento do conteúdo do estroma (A-B) em biótipo S, 8HAA de paraquat.

Após a aplicação de 2,4-D ($1005 \text{ g e.a. ha}^{-1}$) os biótipos foram considerados suscetíveis quando não apresentaram logo após aplicação (cerca de uma hora) pontuações nas folhas características de necrose. Os biótipos “resistentes” foram assim denominados devido a evolução de pontuações necróticas nas folhas, as quais coalescem e recobrem a superfície foliar, sintoma característico de aplicação de herbicidas de contato (Figura 14).

Figura 14 – Evolução do sintoma de rápida necrose após aplicação de 2,4-D. (A) Pontuações necróticas 1HAA em biótipo R; (B) Biótipo S sem sintomas 1HAA; Biótipo suscetível e sintoma de rápida necrose 6 HAA.

A observação em microscopia eletrônica de transmissão permite observar a estrutura celular e os cloroplastos em *C. sumatrensis* antes da aplicação do herbicida (Figura 15).

Figura 15 – Microscopia eletrônica de transmissão de cloroplasto (A) e estrutura celular (B) em biótipo de *C. sumatrensis* antes da aplicação do herbicida.

Observa-se um “inchaço” dos cloroplastos e uma mudança na sua conformação, com o acúmulo da grana (pilha de tilacóides) próximos à membrana e aumento nos grãos de amido armazenados no interior dos cloroplastos após decorrida uma hora da aplicação de 2,4-D no biótipo com rápida necrose (Figura 16).

Figura 16 – Alteração nos cloroplastos em biótipo com rápida necrose de *C. sumatrensis* - 1HAA de 2,4-D. (A) aumento no diâmetro dos cloroplastos; (B) cloroplastos inchados (“swollen chloroplast”).

Tal aumento se dá devido à condição de longa exposição à luz e as dimensões destes grãos variam, entre outros motivos, pela formação de açúcares e armazenamento de amido nas plantas, variando de acordo com o período do dia (Kraus et al., 2006).

Observa-se que no biótipo S, com uma hora após aplicação ainda não é possível visualizar alterações morfológicas nos cloroplastos (Figura 17), o que sugere um aumento nos grãos de amido dos cloroplastos do biótipo R como resposta ao estresse oxidativo causado pela aplicação do herbicida, uma vez que ambos biótipos estavam sob a mesma condição ambiental.

Figura 17 - Microscopia eletrônica de transmissão de biótipo S de *C. sumatrensis* - 1HAA de 2,4-D. Cloroplastos com aparência normal (A-B).

Após 6 horas de aplicação do 2,4-D no biótipo que apresenta rápida necrose a observação da seção do corte em microscopia de transmissão é dificultada devido à rápida degradação da epiderme (Figura 18). Observa-se que as células perdem sua forma e as paredes celulares apresentam-se torcidas.

Figura 18 - Microscopia eletrônica de transmissão de biótipo com rápida necrose de *C. sumatrensis* - 6HAA de 2,4-D. Alterações na epiderme (A), colapso das células do mesófilo (B) e cloroplastos (C).

No biótipo S observa-se a conformação celular e integridade da parede celular na superfície adaxial 6HAA. Conforme citado anteriormente, o 2,4-D é um herbicida considerado hormonal, sistêmico, com translocação pelo floema. Os sintomas nas plantas começam a surgir dias após aplicação, iniciando pelo sintoma de epinastia, esgotamento dos meristemas apicais, levando a uma clorose e posterior necrose. O efeito necrótico do herbicida usualmente se inicia após uma semana (Oliveira JR, 2011).

Figura 19 - Microscopia eletrônica de transmissão de biótipo S de *C. sumatrensis* - 6HAA de 2,4-D. Epiderme sem alteração (A), manutenção da estrutura das células do mesófilo (B), início da diferenciação da estrutura dos cloroplastos - “swollen chloroplast” (C) e cloroplasto sem alteração (D).

Observam-se cloroplastos no biótipo suscetível, 6HAA (Figura 19) onde é possível perceber o início da diferenciação dos mesmos. Pode-se observar o aumento dos grãos de amido (Figura 19C e 19D) como resposta ao estresse oxidativo, que ocorre de forma mais lenta no biótipo S.

Fernandes et al. (2014) observaram comportamento similar na avaliação de seções foliares de *O. gratissimum* (Lamiaceae), variando a quantidade e tamanho dos grãos de amido nos cloroplastos, sendo estes maiores em plantas mantidas sob maior intensidade de radiação luminosa. Os autores citam que tal comportamento pode estar associado com sistema de

defesa do aparato fotossintético devido ao estresse oxidativo em decorrência do aumento da intensidade de radiação.

A oxidação ocorre nas plantas de forma natural como parte do metabolismo celular, produzindo radicais livres (átomos de oxigênio ou nitrogênio com elétrons desemparelhados). Denominados EROs, esses radicais livres estão presentes naturalmente, porém quando em excesso, podem causar peroxidação lipídica das membranas e agressão as proteínas, enzimas e carboidratos. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é considerado um radical livre, pois não possui elétrons desemparelhados na última camada, porém sua ocorrência no tecido vegetal desencadeia reações para produção de radical hidroxila ($\text{HO}^\cdot$), este sim, deletério ao organismo (Garcez et al., 2004; Oliveira & Schoffen, 2010).

Após avaliação de indicadores de estresse oxidativo percebe-se que o biótipo suscetível (S) apresenta maior concentração de peróxido de hidrogênio antes da aplicação do herbicida em relação ao biótipo com rápida necrose (R). Com 3 e 6 HAA a quantidade de H_2O_2 formada é elevada no biótipo R, decaindo 24HAA. Já o biótipo S, que apresenta quantidade inicial alta, mantém sua concentração de H_2O_2 que também decai após 24h (Figura 20).

Figura 20 – Quantificação de estresse oxidativo pela mensuração do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em biótipos (R - S) de *C. sumatrensis* 0, 3, 6 e 24 horas após aplicação de 2,4-D.

A avaliação de peroxidação lipídica pela quantificação de malonaldeído (MDA) mensurada 0, 3, 6 e 24h após aplicação demonstra maior concentração de substâncias reativas

ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no biótipo R, devido ao efeito necrótico que ocorre após aplicação do 2,4-D, causando peroxidação lipídica (Figura 21). Antes da aplicação do herbicida a concentração de MDA-TBA não diferiu entre os biótipos R e S.

Após 24 horas da aplicação de 2,4-D a concentração de MDA nos biótipos apresentando rápida necrose aumentou cerca de 67%, enquanto no biótipo suscetível houve redução de 5,7%. A formação de malonaldeído ocorre quando há estresse causado pela peroxidação lipídica, sendo este um método utilizado para indicar injurias causadas nas membranas devido estresse oxidativo (Esterbauer et al., 1991).

Figura 21 - Quantificação de estresse oxidativo pela mensuração do conteúdo de malonaldeído (MAD) em biótipos (S - R) de *C. sumatrensis* 0, 3, 6 e 24 horas após aplicação de 2,4-D.

Pereira (2019) observou em plantas da mesma espécie comportamento similar quando biótipos R e S foram submetidos a aplicação de Paraquat (800 g i.a. ha⁻¹). Os biótipos apresentam danos à membrana devido estresse oxidativo causado pelo herbicida, porém em R o dano foi ligeiramente menor do que S, podendo ser relacionado à menor produção de EROs ou a maior atividade do sistema antioxidante das plantas.

O modo de ação do herbicida 2,4-D envolve o metabolismo de ácidos nucleicos e plasticidade da parede celular. Os sintomas ocorrem primeiro nos meristemas devido a translocação via floema. A ação do herbicida está relacionada também ao aumento na síntese de auxinas e giberelinas promovendo alongamento celular e crescimento desordenado,

esgotamento, destruição do sistema radicular e morte da planta após alguns dias ou semanas (Foloni, 2016). A concentração de MDA em biótipo S manteve-se praticamente inalterada nas 24h após aplicação devido ao tempo de resposta das plantas após exposição ao herbicida. Em R há comportamento similar ao observado em plantas suscetíveis expostas à herbicidas de contato (paraquat), sendo a resposta de rápida necrose, visualmente, muito similar à aplicação destes produtos (Chiang et al., 2008; Polos et al., 1988; Vaughn & Fuerst, 1985).

A concentração inicial de peróxido de hidrogênio mais elevada no biótipo S pode estar relacionada à resposta a algum fator de estresse, antes da aplicação do herbicida. Uma vez que os dois biótipos foram conduzidos sob mesma condição de ambiente (casa de vegetação) percebe-se que naturalmente estas plantas encontram-se mais estressadas. Avaliando a resposta após aplicação percebe-se que o biótipo R apresenta uma maior alteração em relação que o biótipo S, onde a alteração na concentração de H_2O_2 é menor. Somando-se a avaliação de malonaldeído, onde percebemos que a peroxidação lipídica é maior no biótipo R, observa-se que associada a resposta mais rápida e expressiva em relação a concentração de H_2O_2 e peroxidação lipídica que o biótipo R é mais sensível ao estresse causado pelo herbicida e a ação do sistema antioxidante nestas plantas pode estar atrelada ao sintoma de rápida necrose.

A avaliação de enzimas do sistema antioxidante destas plantas (catalase, superóxido desmutase, ascorbato peroxidase, glutathione redutase) pode apontar diferenças na expressão enzimática atreladas à resposta de concentração de H_2O_2 maior no biótipo com rápida necrose. A alteração na atividade de alguma enzima, ou em sua conformação (isoformas) de alguma destas enzimas do sistema antioxidante pode estar atrelada a este mecanismo.

3.4 Conclusões

O biótipo resistente de *C. sumatrensis* apresenta maior densidade estomática abaxial em relação ao biótipo S em ambos estádios de desenvolvimento. A nível celular, percebe-se que após aplicação de paraquat o biótipo R apresentou manutenção da estrutura celular enquanto biótipo S foi bastante afetado, estando o mecanismo de resistência relacionado à não chegada do herbicida no local de ação.

Em relação a resposta de rápida necrose de 2,4-D observa-se que o biótipo S apresenta maior concentração de H_2O_2 em relação ao biótipo R, porém a resposta após estresse e a peroxidação lipídica no biótipo R é mais expressiva após aplicação do herbicida, causando efeito de necrose que pode ser observado poucas horas após a aplicação.

Referências

- ALBRECHT, A. J. P.; ALBRECHT, L. P.; PIRES, A.; THOMAZINI, G.; LORENZETTI, J. B.; DANILUSSI, M. T. Y. Multiple resistant of Sumatran Fleabane in Paraguay. In: **Weeds International survey of herbicide-resistant weeds**. 2018.
- ALBRECHT, A. J. P.; PIVETTA, L. A.; ALBRECHT, L. P.; SILVA, A. F. M.; PIRES, A.; THOMAZINI, G.; LORENZETTI, J. B.; DANILUSSI, M. T. Y. Buva resistente a herbicidas em el Paraguay. **Informativo Supra Pesquisa**. Ano II, n.2. 2019.
- ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant Cell Environment**, Oxford, v. 24, p. 1337–1344, 2001.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia Vegetal**. 3ª Edição. Editora da Universidade Federal de Viçosa, 404p. 2012.
- AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 280-292, 1998.
- CHIANG, Y.J.; WU, Y. X.; CHIANG, M. Y.; WANG, C. Y. Role of antioxidative system in paraquat resistance of tall fleabane (*Conyza sumatrensis*). **Weed science**, v. 56, n. 3, p. 350-355, 2008.
- CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA JR, R. S.; OLIVEIRA NETO, A. M.; BLAINSKI, E.; GUERRA, N. Manejo da buva na entressafra. In: **Buva: fundamentos e recomendações para manejo**. Omnipax Editora, p. 41-64. 2013.
- ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free radical Biology and medicine**, v. 11, n. 1, p. 81-128, 1991.
- FERNANDES, V. F.; ALMEIDA BEZERRA, L; MIELKE, M. S.; COSTA SILVA, D.; BOMFIM, L. C. C. Anatomia e ultraestrutura foliar de *Ocimum gratissimum* sob diferentes níveis de radiação luminosa. **Ciência Rural**, v. 44, n. 6, p. 1037-1042, (2014).
- FIGUEIREDO, M.; GAINES, T.; NISSEN, S. Resistência de plantas daninhas a herbicidas análogos das auxinas. In: CHRISTOFFOLETI, P. J.; NICOLAI, M. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 4 ed. Piracicaba; ESALQ. 2016.
- FOLONI, L. L. **O Herbicida 2,4-D: Uma Visão Geral**. LabCom Total, Ribeirão Preto. 252 p. 2016.
- FUERST, E. P.; NAKATANI, H. Y.; DODGE, A. D.; PENNER, D.; ARNTZEN, C. J. Paraquat resistance in Conyza. **Plant Physiology**, v. 77, n. 4, p. 984-989, 1985.

GARCEZ, M.; BORDIN, D.; PERES, W.; SALVADOR, M. Radicais livres e espécies reativas. In: SALVADOR, M.; HENRIQUE, J. A. P. **Radicaís livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Ulbra, Canoas, p. 13-33. 2004.

HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. 2019.

IRVINE, J. et al. The response of *Pinus Sylvestris* to drought: stomatal control of transpiration and hydraulic conductance. **Tree physiology**, v. 18, n. 6, p. 393-402, 1998.

KASPARY, T. E.; LAMEGO, F. P.; LANGARO, A. C.; RUCHEL, Q.; AGOSTINETTO, D. Investigation of the mechanism of resistance to glyphosate herbicide in hairy fleabane. **Revista Planta Daninha**, v. 34, n. 3, p. 555-564, 2016.

KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. 37 p. 1998.

KRAUS, T.E.; MCKERSIE, B.D.; FLETCHER, R.A. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 145, p. 570-576, 1995.

KRAUS, J. E.; LOURO, R. P.; ESTELITA, M. E. M.; A. M. A célula vegetal. In: GLÓRIA, B. A.; GUEIRREIRO, S. M. C. **Anatomia vegetal**. Viçosa: Ed. UFF, 2006. P. 39-41.

LAMEGO, F. P.; VIDAL, R. A. Resistance to glyphosate in *Conyza bonariensis* and *Conyza canadensis* biotypes in Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Planta Daninha**, v. 26, n. 2, p. 467-471, 2008.

LIMA JR, E. C.; CASTRO, A. A.; VIEIRA, E. M.; BARBOSA, C. V.; DELFINO, J. P. R. A. Aspectos fisioanatômicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* Camb. submetidas a diferentes níveis de sombreamento. **Revista Árvore**, v. 30, n. 1, p. 33-41, 2006.

MAROCHIO, C. A.; BEVILAQUA, M. R. R.; TAKANO, H. K.; MANGOLIM, C. A.; OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; MACHADO, M. F. P. S. Genetic admixture in species of *Conyza* (Asteraceae) as revealed by microsatellite markers. **Acta Scientiarum**. Agronomy, v. 39, n. 4, p. 437-445, 2017.

NETO, A. M. O.; CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA JÚNIOR, R. S.; GUERRA, N.; ALMEIDA DAN, H.; VILELA, L. M. S.; ÁVILA, L. A. Sistemas de dessecação de manejo com atividade residual no solo para áreas de pousio de inverno infestadas com buva. **Comunicata Scientiae**, v. 4, n. 2, p. 120-128, 2013.

OLIVEIRA JR, R. S. Mecanismos de ação de herbicidas. In: OLIVEIRA JR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, p. 1-36, 2011.

OLIVEIRA, M. C.; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.

PEREIRA, V. G. C. **Caracterização da resistência de *Conyza sumatrensis* ao herbicida paraquat**. Dissertação, Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”. Botucatu-SP, 2019.

PIASECKI, C.; CARVALHO, I. R.; CECHIN, J.; GOULART, F. A.; MAIA, L. C. D.; AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. Oxidative stress and differential antioxidant enzyme activity in glyphosate-resistant and-sensitive hairy fleabane in response to glyphosate treatment. **Bragantia**, [online] In press, 2019.

PILLITTERI, L. J.; SLOAN, D. B.; BOGENSCHUTZ, N. L.; TORII, K. U. Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. **Nature**, v. 445, n. 7127, p. 501, 2007.

PÖLÖS, E.; MIKULÁS, J.; SZIGETI, Z.; MATKOVICS, B.; DO QUY HAI, A.; PÁRDUCZ, A. LEHOCZKI, E. Paraquat and atrazine co-resistance in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 30, n. 2, p. 142-154, 1988.

PÖLÖS, E.; LASKAY, G.; SZIGETI, Z.; PATAKI, SZ.; LEHOCZKI, E. Photosynthetic properties and cross-resistance to some urea herbicides of triazine-resistant *Conyza canadensis* Cronq (L.). **Zeitschrift für Naturforschung C**. v. 42, n. 7-8, p. 783-793, 1987.

SAMSOM, M.; SABORIDO, A. A.; DUBOIS, M. Control of *Conyza* spp. with glyphosate – a review of the situation in Europe. **Plant Protection Science**, v. 49, n. 1, p. 44-53, 2013.

SANTOS, F.M.; VARGAS, L.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; AGOSTINETTO, D.; MARTIN, T.N.; RUCHEL, Q.; FERNANDO, J.A. Estádio de desenvolvimento e superfície foliar reduzem a eficiência de chlorimuron-ethyl e glyphosate em *Conyza sumatrensis*. **Planta daninha**, v. 32, n. 2, p. 361-375, 2014.

VAN HORN, C. R.; MORETTI, M. L.; ROBERTSON, R. R.; SEGOBYE, K.; WELLER, S. C.; YOUNG, B. G.; LESPÉRANCE, M. A. Glyphosate resistance in *Ambrosia trifida*: Part 1. Novel rapid cell death response to glyphosate. **Pest management science**, v. 74, n. 5, p. 1071-1078, 2018.

VAUGHN, K. C.; FUERST, E. P. Structural and physiological studies of paraquat-resistant *Conyza*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 24, n. 1, p. 86-94, 1985.

ZHENG, D.; KRUGER, G. R.; SINGH, S.; DAVIS, V. M.; TRANEL, P.J.; WELLER, S. C.; JOHNSON, W. G. Cross-resistance of horseweed (*Conyza canadensis*) populations with three different ALS mutations. **Pest management science**, v. 67, n. 12, p. 1486-1492, 2011.

ZOBIOLE, L. H. S.; PEREIRA, V. G. C.; ALBRECHT, A. J. P.; RUBIN, R. S.; ADEGAS, F. S.; ALBRECHT, L. P. Paraquat Resistance of Sumatran Fleabane (*Conyza sumatrensis*). **Revista Planta Daninha**, v. 37, 2019.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em *Conyza bonariensis* há diferenciação na morfologia da superfície foliar entre biótipo suscetível e resistente em dois estádios de desenvolvimento, possivelmente relacionados à retenção de herbicidas, sua absorção e eficácia. O fator de resistência observado foi de 31,49 e a ocorrência de biótipos com controle pobre após aplicação de glyphosate foi alta.

Em *C. sumatrensis*, alterações a níveis celular após aplicação dos herbicidas pode ser utilizada para observar a nível celular o mecanismo de resistência ao paraquat e a resposta de rápida necrose de 2,4-D. Estudos de indicador de estresse oxidativo indicam que o biótipo suscetível apresenta-se naturalmente mais estressado, com maior concentração de H_2O_2 em relação ao biótipo com resposta de rápida necrose. Já o biótipo com rápida necrose é mais responsivo após aplicação do herbicida (2,4-D) e tem maior estresse oxidativo e injúrias nas membranas, conforme observa-se pelo sintoma rápido de necrose.

Trata-se do primeiro relato de comportamento de rápida necrose após a aplicação de um herbicida sistêmico (2,4-D) no Brasil. A avaliação de enzimas do sistema antioxidante e de resposta hipersensível das plantas devem ser consideradas para elucidar tal mecanismo.