

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TESE

**ALTERAÇÕES ANATÔMICAS, NA ABSORÇÃO E TRANSLOCAÇÃO DE
HERBICIDAS COMO MECANISMO DE RESISTENCIA EM *Conyza sumatrensis***

AMANDA DOS SANTOS SOUZA

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**ALTERAÇÕES ANATÔMICAS E NA ABSORÇÃO E TRANSLOCAÇÃO DE
HERBICIDAS COMO MECANISMO DE RESISTENCIA EM *Conyza sumatrensis***

AMANDA DOS SANTOS SOUZA

Sob a Orientação da Professora
Camila Ferreira de Pinho

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Fitotecnia**, no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Área de Concentração, Fisiologia da Produção.

Seropédica, RJ
Junho de 2022

S719a Souza, Amanda dos Santos, 1991-
Alterações anatômicas e na absorção e translocação de herbicidas como mecanismo de resistência em *Conyza sumatrensis* / Amanda dos Santos Souza. - Seropédica, 2022.
101 f.: il.

Orientadora: Camila Ferreira de Pinho.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, 2022.

1. Caracterização anatômica . 2. Metabolismo de herbicidas. 3. Buva. 4. Resistência ao 2,4-D. 5. Rápida necrose. I. Pinho, Camila Ferreira de, 1986-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA



HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO Nº 4 / 2023 - DeptFITO (12.28.01.00.00.32)

Nº do Protocolo: 23083.013356/2023-31

Seropédica-RJ, 09 de março de 2023.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

AMANDA DOS SANTOS SOUZA

Dissertação/Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Fitotecnia**, no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de Concentração em Fisiologia da Produção.

TESE APROVADA EM 23/06/2022

Camila Ferreira de Pinho Dr.^a UFRRJ

(Orientadora)

Aroldo Ferreira Lopes Machado. Dr. UFRRJ

Anderson Luis Nunes. Dr. IFRS

Catarine Markus. Dr.^a. UFRGS

Luiz Ricardo Tozin. Dr. UFRRJ

(Assinado digitalmente em 09/03/2023 12:02)

AROLDO FERREIRA LOPES MACHADO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptFITO (12.28.01.00.00.32)
Matrícula: 1905333

(Assinado digitalmente em 09/03/2023 11:31)

CAMILA FERREIRA DE PINHO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
PPGF (12.28.01.00.00.26)
Matrícula: 2466219

(Assinado digitalmente em 10/03/2023 09:26)

LUIZ RICARDO DOS SANTOS TOZIN
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptBOT (12.28.01.00.00.46)
Matrícula: 3058137

(Assinado digitalmente em 13/03/2023 09:26)

CATARINE MARKUS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 015.689.230-82

(Assinado digitalmente em 13/03/2023 15:10)

ANDERSON LUIS NUNES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
CPF: 036.829.719-55

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **4**, ano: **2023**, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO**, data de emissão: **09/03/2023** e o código de verificação: **d16ca0c967**

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar o dom da vida, alegria e todas as bênçãos recebidas.

A minha família pelo interminável apoio, sem o qual não chegaria até aqui.

Em memória a minha avó Dulcenéia, Vilma e meu avô Amaury, por me fazerem acreditar que tudo daria certo, sinto muito a falta de vocês.

Aos meus pais Djane e Sérgio, por todo amor, conselhos, puxões de orelha e mensagens de bom dia, não sei o que seria de mim sem vocês. Amo vocês incondicionalmente.

Ao meu irmão Vinícius, por estar sempre vibrando com as minhas vitórias, e por me dar as sobrinhas mais lindas do mundo Clarissa e Helena. Amo vocês incondicionalmente.

A minha família, por momentos de descontração, churrasco de fim de semana e por sempre mostrarem o orgulho por ter a primeira pessoa na família a ter o título de Doutora.

A professora Dr. Camila Ferreira de Pinho, pela orientação, ensinamentos, confiança e pelo doutorado sanduiche, os retornos positivos que tenho hoje, são em decorrência de todos esses anos de trabalho e dedicação a minha carreira acadêmica.

A Colorado State University e ao Weed lab, em especial aos professores Todd e Scott pela parceria e todo o aprendizado, o tempo que passei com vocês foi *amazing*.

Ao meu gatinho, por me mostrar o lado mais bonito do Colorado, pela parceria, mesmo a distância e caronas nos dias de neve, te amo mais.

Aos amigos ruralinos, por me apoiarem nas horas que eu mais precisei, por sinceras demonstrações de amizade, carinho e pela diversão.

As minhas amigas de infância, que sempre me disseram que o melhor a fazer era nunca desistir independentemente de qualquer acontecimento.

Ao grupo PDPA, melhor família PDPA, por tornarem momentos gratificantes, por toda ajuda física, intelectual e psicológica.

A banca por aceitar fazer parte da defesa da tese e pelas relevantes contribuições.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ, ao Programa de Pós Graduação em Fitotecnia- PPGF e a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro- FAPERJ.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”

Enfim, quero agradecer a todos que de algum modo fizeram a diferença na minha vida, por cada momento vivido, saibam que o que sou hoje é reflexo de cada parte de vocês.

*A voz de minha bisavó
ecoou criança
nos porões do navio.
ecoou lamentos
de uma infância perdida.*

*A voz de minha avó
ecoou obediência
aos brancos-donos de tudo.*

*A voz de minha mãe
ecoou baixinho revolta
no fundo das cozinhas alheias
debaixo das trouxas
roupagens sujas dos brancos
pelo caminho empoeirado
rumo à favela.*

*A minha voz ainda
ecoa versos perplexos
com rimas de sangue
e fome.*

*A voz de minha filha
recolhe todas as nossas vozes
recolhe em si
as vozes mudas caladas
engasgadas nas gargantas.*

*A voz de minha filha
recolhe em si
a fala e o ato.
O ontem – o hoje – o agora.
Na voz de minha filha
se fará ouvir a ressonância
o eco da vida-liberdade.*

Conceição Evaristo

RESUMO

SOUZA, Amanda dos Santos. **Alterações anatômicas e na absorção e translocação de herbicidas como mecanismo de resistência em *Conyza sumatrensis***. 2021. 107p. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

A elucidação dos mecanismos de resistência de *Conyza sumatrensis* a herbicidas é de extrema importância para o manejo eficiente desta espécie no campo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a anatomia diferencial alterações anatômicas, absorção e translocação reduzida, além da metabolização de herbicidas no biótipo de *Conyza sumatrensis* resistente a cinco mecanismos de ação e propor um manejo eficiente para controle deste biótipo. Em todos os capítulos foram avaliados um biótipo resistente e um biótipo suscetível para fins de comparação. CAPÍTULO I: Foram avaliados quanto a diferenciação anatômica biótipos de *Conyza sumatrensis*, após a aplicação do herbicida 2,4-D (1005g e.a ha⁻¹). Foram realizadas duas técnicas: ¹Microscopia de luz: as folhas foram coletadas e analisadas 15 e 30 minutos após aplicação (MAA). ³Microscopia eletrônica de varredura: as folhas dos biótipos suscetíveis e resistentes foram coletadas 30 MAA e 3 horas após aplicação (HAA). CAPÍTULO II: Foram avaliados quanto a absorção e translocação em biótipos de *Conyza sumatrensis*, após a aplicação dos herbicidas 2,4-D (1005 g e. a ha⁻¹). Foram realizados três experimentos: ¹Foram avaliados quanto absorção e translocação o ¹⁴C-2,4-D aos 3, 12, 24, 48 e 96 HAA. ²Foi avaliado a metabolização dos biótipos suscetíveis e resistente as 3, 12, 24, 48 e 96 HAA. ³Foi avaliado o efeito do pré-tratamento com malation no controle do biótipo resistente, foram avaliados os sintomas aos 7, 14 e 35 DAA. CAPÍTULO III: Foram realizados dois experimentos. ¹O experimento foi conduzido em casa de vegetação. Os herbicidas glifosato (720g ia ha⁻¹); 2,4-D (1005g ia ha⁻¹); triclopir (720g ia ha⁻¹); halauxifen-metil+diclosulam (5,17+25,5g ia ha⁻¹) e dicamba (480g ia ha⁻¹); foram aplicados isolados, e os auxínicos em mistura com o glifosato (720g ia ha⁻¹); ainda, as misturas com glifosato foram avaliadas com adição de saflufenacil (35g ia ha⁻¹) ou sequencial de glufosinato de amônio (400g ia ha⁻¹) aplicado 10 dias após a primeira aplicação (DAPA). As 4 e 48 horas, 10, 15 e 35 DAPA realizou-se análise de controle visual e aos 35 DAPA a MSPA. ²O experimento foi conduzido a campo. Os herbicidas 2,4-D (1005g ia ha⁻¹); triclopir (720 g ia ha⁻¹); halauxifen-metil+diclosulam (6,5+31,8g ia ha⁻¹) e dicamba (384g ia ha⁻¹) em associação com o glifosato (1200g ea ha⁻¹); as mesmas associações com adição de saflufenacil (35g ia ha⁻¹) ou sequencial de glufosinato de amônio (400g ia ha⁻¹) aos 8 DAPA. Aos 14 e 50 DAPA foram realizadas análises visuais de controle. CAPÍTULO IV: Foram avaliados quanto a absorção e translocação em biótipos de *Conyza sumatrensis*, após a aplicação do herbicida glifosato (720 g e. a ha⁻¹) e saflufenacil (70g i.a ha⁻¹). Foram realizados dois experimentos. Foram avaliados quanto absorção e translocação o ²¹⁴C-glifosato 24, 48, 72, 96 e 120 HAA e o ³¹⁴C-saflufenacil aos 6, 12, 24, 48 e 72HAA. CAPÍTULO I: Houve diferença entre os biótipos após a aplicação, foi possível observar diferenças anatômicas na espessura de epiderme superior, mesofilo e espaços intercelures entre os biótipos após aplicação do herbicida 2,4-D. CAPÍTULO II: a translocação reduzida do herbicida 2,4-D é um dos mecanismos de resistência do biótipo resistente de *Conyza sumatrensis* ao herbicida 2,4-D, não foi observado metabolização do herbicida 2,4-D. CAPÍTULO III: Não foi observado resistência cruzada. A aplicação de glifosato+auxinas em mistura com o herbicida saflufenacil ou sequencial com o herbicida glufosinato de amônio se mostraram excelentes estratégias de controle do biótipo resistente de *Conyza sumatrensis*. CAPÍTULO IV: Não houve diferença entre os biótipos na absorção e translocação do herbicida glifosato e saflufenacil. A elucidação dos mecanismos envolvidos na resistência de *Conyza sumatrensis* com rápida necrose, podem ser relacionados com as alterações anatômicas e redução da translocação para o herbicida 2,4-D.

Palavras-chaves: caracterização anatômica, metabolismo de herbicidas, buva, resistência ao 2,4-D, rápida necrose

ABSTRACT

SOUZA, Amanda dos Santos. **Anatomical changes and in the absorption and translocation of herbicides as a resistance mechanism in *Conyza sumatrensis***. 2021. 107p. Tesis (PhD in Fitotecnia). Institute of Agronomy, Department of Fitotecnia, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

The elucidation of the resistance mechanisms of *Conyza sumatrensis* to herbicides is extremely important for the efficient management of this species in the field. The objective of this research was to evaluate the differential anatomy, reduced absorption and translocation, and metabolism of herbicides in the *Conyza sumatrensis* biotype resistant to five mechanisms of action and to propose an efficient management to control this biotype. In all chapter, a resistant and susceptible biotype were evaluated for comparison purpose. CHAPTER I: *Conyza sumatrensis* biotypes were evaluated for anatomical differentiation after application of the 2,4-D (1005g a.e ha⁻¹) herbicide. Two experiments were carried out: ¹Light microscopy, the leaves of resistant and susceptible were collected and analyzed 15 and 30 minutes after application (MAA). ²Scanning electron microscopy: leaves of resistant and susceptible biotypes were collected 30 MAA and 3 hours after application (HAA). CHAPTER II: Absorption and translocation were evaluated in *Conyza sumatrensis* after the 2,4-D (1005 g e. a ha⁻¹) herbicide application. Three experiments were carried out: ¹¹⁴C-2,4-D absorption and translocation was evaluated at 3, 12, 24, 48 and 96 HAA. ²¹⁴C-2,4-D metabolism was evaluated at 3, 12, 24, 48 and 96 HAA. ³The effect of pretreatment with malathion on the control of the resistant biotype was evaluated, the symptoms were evaluated at 7, 14 and 35DAA. CHAPTER III: Management strategies were evaluated to control the resistant biotype of *Conyza sumatrensis*. Two experiments were carried out: ¹The experiment was conducted in a greenhouse. Glyphosate herbicides (720g ia ha⁻¹); 2,4-D (1005g ai ha⁻¹); triclopyr (720g ai ha⁻¹); halauxifen-methyl+diclosulam (5.17+25.5g ia ha⁻¹) and dicamba (480g ia ha⁻¹); isolates were applied and auxinics with glyphosate (720g ai ha⁻¹), the same with addition of saflufenacil (35g ia ha⁻¹) or sequential ammonium glufosinate (400g ia ha⁻¹) applied 10 days after the first application (DAPA). At 4 and 48 hours, 10, 15 and 35 DAPA, visual control analysis was performed and at 35 DAPA, MSPA. ²The experiment was conducted in the field. 2,4-D herbicides (1005g ai ha⁻¹); triclopyr (720 g ai ha⁻¹); halauxifen-methyl + diclosulam (6.5+31.8g ia ha⁻¹) and dicamba (384g ia ha⁻¹) in association with glyphosate (1200g ea ha⁻¹); the same associations with addition of saflufenacil (35g ai ha⁻¹) or sequential ammonium glufosinate (400g ai ha⁻¹) at 8 DAPA. At 14 and 50 DAPA, visual control analyzes were performed. CHAPTER IV: Two experiments were carried out. ¹⁴C-glyphosate absorption and translocation were evaluated at 24, 48, 72 and 120 HAA and ²¹⁴C-saflufenacil absorption and translocation at 6, 12, 24, 48 e 72HAA. CHAPTER I: There was a difference between the biotypes after application, it was possible to observe anatomical differences in the resistant biotype after application of the herbicide 2,4-D. CHAPTER II: The reduced translocation of the herbicide 2,4-D is one of the resistance mechanisms for the resistant biotype of *Conyza sumatrensis*, 2,4-D metabolism was not observed. CHAPTER III: The application in mixture with the herbicide saflufenacil or sequential with the herbicide glufosinate proved to be excellent strategies to control the resistant biotype of *Conyza sumatrensis*. CHAPTER IV: There was no difference between the biotypes in the absorption and translocation of the herbicide glyphosate and saflufenacil. The elucidation of the mechanisms involved in the resistance of *Conyza sumatrensis* with rapid necrosis may be related to anatomical changes and reduced translocation to the 2,4-D herbicide.

Keywords: anatomical characterization, herbicide metabolism, resistance to 2,4-D, rapid necrosis

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	1
2	REVISÃO DE LITERATURA GERAL.....	2
2.1	Plantas Daninhas	2
2.2	<i>Conyza</i> spp.	2
2.3	Resistência de plantas daninhas a herbicidas	5
2.4	Morte celular	7
2.5	Absorção e translocação de herbicidas	9
3	CAPÍTULO I.....	13
3.1	INTRODUCTION	16
3.2	MATERIALS AND METHODS.....	17
3.2.1	Plant materials and growth conditions.....	17
3.2.2	Anatomical and micromorphological Analysis	17
3.3	RESULTS.....	18
3.3.1	Anatomical characterization	18
3.4	DISCUSSION.....	22
3.5	CONCLUSION	24
3.6	REFERENCES	25
4	CAPÍTULO III	29
4.1	INTRODUCTION	32
4.2	MATERIALS E METHODS.....	34
4.2.1	Plant Material	34
4.2.2	Plant growth conditions	34
4.2.3	[¹⁴ C]2,4-D absorption and translocation.....	34
4.2.4	Metabolism Experiment [¹⁴ C]-2,4-D.....	35
4.2.5	Malathion effect on 2,4-D resistance.....	35
4.2.6	Statistical Analyses.....	36
4.3	RESULTS AND DISCUSSION.....	37
4.3.1	[¹⁴ C]2,4-D absorption and translocation.....	37
4.3.2	Metabolism Experiment ¹⁴ C-2,4-D.....	39
4.3.3	2,4-D dose response metabolism experiment with P450 inhibitors	40
4.4	CONCLUSIONS.....	42
4.5	REFERENCES	43
5	CAPÍTULO III	47
5.1	INTRODUÇÃO	50
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	52
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.4	CONCLUSÕES.....	59
5.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	60

6	CAPÍTULO IV.....	67
6.1	INTRODUÇÃO	70
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	72
6.2.1	Material Vegetal	72
6.2.2	¹⁴ C-saflufenacil absorção e translocação	72
6.2.3	¹⁴ C-glifosato absorção e translocação.....	73
6.2.4	Análise estatística	74
6.3	RESULTADOS E DISSCUSSÃO	75
6.3.1	Avaliação da translocação do herbicida ¹⁴ C-saflufenacil	75
6.3.2	Avaliação da translocação do herbicida ¹⁴ C-glifosato.....	76
6.4	CONCLUSÕES.....	78
6.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1 INTRODUÇÃO GERAL

Plantas do gênero *Conyza* são consideradas plantas daninhas em mais de 40 cultivos no mundo. Estas são espécies altamente prolíficas, podendo produzir entre 60 e 200 mil sementes viáveis por planta, que são facilmente dispersas pelo vento (LAZAROTO et al., 2008). O gênero *Conyza* possui alto potencial competitivo o que pode vir a causar danos diretos e indiretos às culturas (SANTOS et al., 2014). Estima-se que os custos de produção podem ser superiores a 222% quando presentes plantas de *Conyza* spp. em lavouras de soja (VARGAS et al., 2013). Em decorrência dos prejuízos causados a cultura, os métodos de controle de plantas daninhas destacam-se como importantes ferramentas para impedir que ocorra perdas tanto em qualidade como em quantidade do produto colhido (PEIRIS, 2016).

Dentre os métodos de controle, o mais utilizado é o químico, quando comparado a outros métodos. Este consiste na utilização de herbicidas, que possuem rápida ação e eficiência no controle de plantas daninhas, além disso, interferem nos processos bioquímicos e fisiológicos, retardando ou inibindo seu crescimento (BUENO et al., 2013). Porém a excessiva utilização e dependência de herbicidas do mesmo mecanismo de ação em sistemas de cultivo, resultou em um maior desenvolvimento de populações de plantas daninhas resistentes. A resistência das plantas daninhas vem evoluindo ao longo do tempo por todo o mundo, ocasionado pela pressão de seleção causada pelos herbicidas. (CHRISTOFFOLETI et al., 2004).

Atualmente, para a espécie *Conyza sumatrensis*, existem 20 relatos de resistência, ocorrendo no ano de 2017, no Brasil, resistência múltipla a cinco herbicidas de diferentes mecanismos de ação (PINHO et al., 2019; HEAP, 2022). A resistência múltipla, ocorre quando um biótipo possui resistência há mais de um mecanismo de ação herbicida (TRANDEL et al., 2011), sendo esta resistência considerada um problema de maior complexidade e de difícil solução. O biótipo da espécie *Conyza sumatrensis*, em estudo nesta pesquisa, apresenta resistência aos mecanismos de ação herbicida: Inibidor do Fotossistema I (FSI), Inibidor do Fotossistema II (FSII), Mimetizador de Auxina (Auxinic), Inibidor da 5-enolpiruvilshiquimato-3-fostato sintase (EPSPs) e Inibidores da Protoporfirinogênio IV oxidase (PROTOX) representados pelos herbicidas paraquat, diuron, 2,4-D, glifosato e saflufenacil, respectivamente.

A resistência é o resultado da adaptação evolutiva das plantas daninhas a aplicação de herbicidas e são conhecidas duas categorias de mecanismo de resistência: resistência no sítio-alvo (TSR) e resistência fora do sítio-alvo (NTSR) (DÉLYE et al., 2013). O mecanismo TSR, inclui alterações no gene que codifica a proteína-alvo ou alterações estruturais no sítio de ligação do herbicida, que causa uma redução na eficácia da ação direta do herbicida no seu alvo (DÉYLE, 2013). O mecanismo NTSR, pode ser devida a qualquer um ou uma combinação de mecanismos que limitam a quantidade de herbicida que atinge um local alvo (GAINES et al., 2010).

Sendo assim, o objetivo da pesquisa foi avaliar as alterações anatômicas, absorção e translocação reduzida, além da metabolização de herbicidas do no biótipo de *Conyza sumatrensis* resistente a cinco mecanismos de ação e propor melhor um manejo eficiente para controle deste biótipo.

2 REVISÃO DE LITERATURA GERAL

2.1 Plantas Daninhas

O setor agrícola é um dos mais importantes na economia brasileira, sendo responsável por aproximadamente R\$100 bilhões em volume de exportações em conjunto com a pecuária. Além disso, as atividades agrícolas no país são umas das principais responsáveis pelos valores da balança comercial (IPEA, 2022). A produção agrícola brasileira vem se expandindo rapidamente, do ano 1970 a 2017 foi observado crescimento médio anual de 4,3%, equivalente a um aumento de seis vezes na produção agrícola bruta e a um quarto da produção global de alimentos (FAO, 2017). Esta rápida expansão tornou o Brasil, no ano de 2020 o quarto maior produtor e o segundo maior exportador de grãos do mundo, com 19% do mercado internacional (FAO, 2020).

Os principais produtos agrícolas produzidos no Brasil são soja, milho, cana-de-açúcar e café (IBGE, 2021). Nesses sistemas produtivos é comum se deparar com plantas daninhas, as quais limitam a expressão do potencial produtivo das culturas. Plantas daninhas são espécies que afetam negativamente o crescimento, desenvolvimento e rendimento das culturas, competindo e limitando recursos essenciais, como luz, água e nutrientes (HARPER, 1997; SWANTON et al., 2015). As plantas daninhas apresentam características que lhe conferem elevada agressividade, pois são de rápida germinação e crescimento inicial, possuem eficiência elevada no uso da água, grande produção e disseminação de propágulos de alta viabilidade e longevidade. A presença destas plantas nas áreas de plantio pode onerar os custos das práticas culturais, dificultar e até inviabilizar a colheita e provocar maior desgaste das máquinas (VASCONCELOS et al., 2012).

Em decorrência dos prejuízos causados à cultura, os métodos de controle de plantas daninhas destacam-se como importante ferramenta para impedir que ocorra perdas em qualidade e quantidade (PEIRIS, 2016). Os métodos de controle utilizados são o mecânico, o químico e o cultural, podendo ser usados isoladamente ou em conjunto (SILVA et al., 2012). Sempre que possível deve-se utilizar dois ou mais métodos de manejo, visando minimizar ou mesmo eliminar a interferência causada pelas plantas daninhas na cultura, oferecendo assim maior eficácia, redução de custos, com maior segurança para o homem e menor dano ao ambiente (SIQUEIRA et al., 2014). Quando comparado a outros métodos de controle, o controle químico é o mais utilizado, por ser de mais rápida ação e eficiente no controle de plantas daninhas. Este tipo de manejo consiste na utilização de herbicidas, onde irão interferir nos processos bioquímicos e fisiológicos, podendo retardar ou inibir o crescimento de plantas daninhas (BUENO et al., 2013). Porém o uso repetido de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação por sucessivas safras pode selecionar biótipos de plantas daninhas resistentes (CHRISTOFFOLETI & LÓPEZ-OVEJERO, 2003).

2.2 *Conyza* spp.

Plantas do gênero *Conyza* são membros da família Asteraceae, a maior família das angiospermas, com 1.700 gêneros e 25.000 espécies, aproximadamente. As plantas pertencentes a esta família são divididas em 12 subfamílias e 43 tribos e consideradas um grupo monofilético, ou seja, compartilham de um mesmo ancestral comum (FUNK et al., 2009). O gênero *Conyza* está distribuído por todos os continentes, sendo seu centro de origem o continente americano. Durante os últimos três séculos, o gênero foi amplamente distribuído na

Europa, Austrália, África e Ásia, introduzidos pela ação do homem. (FUNK et al., 2009; URDAMPILLETA et al., 2005).

Dentre o gênero *Conyza* merecem destaque as espécies *Conyza bonariensis*, *Conyza canadensis* e *Conyza sumatrensis* (THEBAUD & ABBOTT, 1995). A espécie *Conyza bonariensis*, possui como centro de dispersão a América do Sul, ocorrendo intensamente em zonas subtropicais e temperadas. A *Conyza canadensis* possui seu centro de distribuição a América do Norte, em regiões de clima temperado ou subtropical do hemisfério norte e nas regiões subtropicais do hemisfério sul (KISSMANN & GROTH, 1999). A *Conyza sumatrensis*, espécie em estudo, está presente nas regiões mais quentes de todos os continentes (THEBAUD & ABBOTT, 1995).

A espécie *Conyza sumatrensis* possui ciclo anual e dependendo das condições ambientais podem apresentar fluxos de emergência durante diferentes períodos do ano. A alta proliferação de sementes contribui para a rápida disseminação das espécies. Uma planta de *Conyza sumatrensis*, produz em média, 60.000 mil sementes por planta (GREEN, 2010). Essa espécie apresenta ampla adaptação ecológica, sendo infestantes em sistemas de plantio direto, culturas perenes, cultivo mínimo e em áreas de fruticultura (BHOWMIK & BEKECH, 1993). Além disso, ocorrem de forma intensa em áreas abandonadas, áreas que estão em pousio e perímetros urbanos (KISSMANN & GROTH, 1999).

A classificação das espécies é baseada nas características morfológicas das plantas; a espécie *Conyza sumatrensis*, apresenta porte ereto, com numerosas hastes ramificadas em inflorescência. O caule é coberto com dois tipos de pelo (curtos e longos), as folhas são numerosas, simples alternas. As folhas inferiores contêm formato elíptico-lanceolado para oblongo-ovado, peciolado, remotamente denteado (com 3-6 dentes de cada lado), enquanto as folhas superiores/medianas são progressivamente menores de formato linear-lanceolado a linear. As dimensões das folhas são de aproximadamente 4-10 x 0,6-1 cm e apresentam uma grande quantidade de pelos na face adaxial e abaxial (ANASTASIU & MEMEDEMINE, 2012; ULZURRUN et al., 2018).

A inflorescência é formada por uma panícula piramidal, com aproximadamente 30-50 cm de comprimento. As flores são reunidas em capítulos cujas brácteas possuem grande quantidade de pelos, possuem coloração verde-acinzentada, de formato linear-lanceolado. Possuem flores femininas (com lígulas esbranquiçadas muito curtas) e flores hermafroditas (com corola amarela). Os aquênios possuem entre 1-1,5 cm de comprimento e com papus de 3-5 mm de comprimento de coloração castanho-claro (ANASTASIU & MEMEDEMINE, 2012).

O manejo do gênero *Conyza*, deve ser baseado na biologia da planta, na forma que estão estruturadas e no entendimento dos efeitos que estimulam a germinação das sementes, como temperatura, luminosidade, umidade do solo. A temperatura tem papel fundamental, pois interfere na velocidade de absorção da água e em todas as reações bioquímicas que influenciam a germinação das sementes (SANTOS et al., 2014). A temperatura ótima para germinação de *Conyza sumatrensis* ocorre entre 15 e 25°C (GIANELLI et al., 2017). Isso esclarece o fluxo de emergência das plântulas no início da primavera e no outono/inverno, onde as temperaturas encontram-se próximas a 20°C.

A luz é outro fator que influencia na germinação das sementes, sendo as espécies consideradas fotoblásticas positivas (SANTOS et al., 2013). Sementes de *Conyza sumatrensis* apresentaram germinação de 91,6% quando mantidas 12 horas na luz com temperatura de 25°C (HAO et al., 2009); e 96%, quando a espécie foi submetida a 8hs de luz a 15°C (CASE & CRAWLEY, 2000).

A disponibilidade de água no solo também é considerada um fator essencial e limitante para a germinação das plantas (YAMASHITA & GUIMARÃES, 2010). A disponibilidade hídrica regula a germinação e a velocidade de germinação das sementes, pois participa de todas as etapas metabólicas, reações enzimáticas e digestão hidrolítica de proteínas, carboidratos e

lipídios dos tecidos de reserva das sementes (BEWLEY & BLACK, 1994; CARVALHO & NAKAGAWA, 2000). Reduções na germinação e na velocidade de germinação foram observadas para as espécies *Conyza canadensis* e *Conyza bonariensis* em potências de água inferiores a -0,15 MPa; decrescendo para menos 50% quando as sementes foram colocadas em percentual de -0,40MPa (YAMASHITA & GUIMARÃES, 2010).

Tendo em vista todos esses fatores, algumas práticas culturais ou mecânicas podem ser utilizadas para minimizar a germinação das sementes, assim como os danos diretos e indiretos causados com a presença das plantas de *Conyza sumatrensis* em áreas de plantio. No entanto, o manejo químico com o uso de herbicidas é o mais utilizado; a excessiva utilização e dependência de herbicidas do mesmo mecanismo de ação em sistemas de cultivo, resulta em maior desenvolvimento de populações de plantas daninhas resistentes, atuando os herbicidas como agentes de seleção (CHRISTOFFOLETI et al., 2004).

O gênero *Conyza* desenvolveu resistência a diferentes mecanismos de ação, havendo atualmente 108 casos relatados no mundo, (HEAP, 2022). Os primeiros casos ocorreram no ano de 1980, no Japão e Taiwan, ao herbicida inibidor do fotossistema I (FSI). Atualmente, para a espécie *Conyza sumatrensis*, existem 20 casos de plantas daninhas resistentes, ocorrendo no ano de 2017, no Brasil, relato de resistência múltipla a cinco mecanismo de ação herbicida; sendo estes: Inibidor do Fotossistema I (FSI), Inibidor do Fotossistema II (FSII), Mimetizador de Auxina (Auxinic), Inibidor da 5-enolpiruvilshiquimato-3-fostato sintase (EPSPs) e Inibidores da Protoporfirinogênio IV oxidase (PROTOX) representados pelos herbicidas paraquat, diuron, 2,4-D, glifosato e saflufenacil, respectivamente (HEAP, 2022).

Diversas pesquisas foram realizadas com o objetivo de elucidar os mecanismos de resistências do gênero *Conyza*, desde o surgimento do primeiro relato de resistência no Brasil ao herbicida glifosato em 2005 (MOREIRA et al., 2007, HEAP, 2018). Com isso, o uso de herbicidas com diferentes mecanismos de ação, passaram a ser utilizados como alternativa de manejo, uma vez que, somente a aplicação do glifosato não era eficiente. Como resultado houve aumento da poluição de plantas de *Conyza* resistentes a diferentes mecanismos de ação, como relatado em 2011 aos herbicidas inibidores da ALS (SANTOS et al., 2014; HEAP, 2022) que foram utilizados como principal alternativa ao glifosato em um primeiro momento. E o cenário ainda fica mais preocupante com a resistência múltiplas aos herbicidas glifosato, chlorimuron e paraquat em 2016 (HEAP, 2022) e em 2017 aos herbicidas paraquat, saflufenacil, 2,4-D, diuron e glifosato (HEAP, 2022).

O herbicida paraquat, era uma das principais opções de herbicidas não seletivos para o controle de *Conyza* spp.. Este herbicida age capturando elétrons do fotossistema I em cloroplastos inibindo a produção de NADPH. Os elétrons livres do fotossistema I, reagem com o herbicida e produzem radicais livres (GRAVINA et al., 2017). Para este herbicida, foram relatadas resistência a 72 espécies de plantas daninhas (HEAP, 2022). O mecanismo que confere alto nível de resistência ao paraquat parece ser o sequestro vacuolar pois outros mecanismos como, aumento da tolerância ao estresse oxidativo apenas causam baixos níveis de resistência (HAWKES, 2014). Para a espécie de *Lolium rigidum*, o mecanismo de resistência é o sequestro vacuolar, com acúmulo do herbicida em protoplastos foliares (YU et al., 2010). Atualmente o herbicida paraquat tem uso proibido no Brasil, porém um substituto potencial no campo é o herbicida diquat, ao qual já existe resistência relatada em biótipo de *Conyza sumatrensis* (LEAL et al., 2022).

O herbicida saflufenacil, inibidor da PROTOX, também é uma alternativa de manejo utilizada principalmente em dessecação de culturas, este é aplicado isolado ou em mistura com o herbicida glifosato (DALAZEN et al., 2015). Porém, já foram relatados resistência a este herbicida para as espécies *Euphorbia heterophylla* e *Conyza sumatrensis* (HEAP, 2022). Este herbicida age inibindo biossíntese de clorofila e heme pela inibição competitiva da PROTOX. Como consequência o protoporfirinogênio IX, não é convertido em protoporfirina IX em

cloroplastos e o protoporfirinogênio IX se acumula até extravasar dos cloroplastos para o citoplasma. A protoporfirina reage com a luz e oxigênio, formando oxigênio singlete radical que causa peroxidação lipídica (JACOBS, et al., 1991, WARABI et al., 2001). A tolerância das plantas a este herbicida, pode ser atribuída à absorção e translocação reduzida, sequestro do herbicida ou concentração aumentada da enzima PROTOX (WARABI et al., 2001).

Uma das principais práticas realizadas no campo é mistura de herbicidas em dessecação pré-plantio para manejo de plantas daninhas de folhas largas de difícil controle com uso de glifosato associado ao 2,4-D (TAKANO et al., 2013). O 2,4-D é amplamente utilizado para controle de plantas eudicotilédneas, já que apresenta baixo custo, seletividade, eficácia e amplo espectro de controle de plantas daninhas (JUGULAM et al., 2013). Para este herbicida há poucos relatos de que a absorção diferencial e a translocação, sejam o mecanismo de resistência. Para o biótipo de *Raphanus raphanistrum*, suspeita-se que haja maior translocação no biótipo resistente quando comparado ao suscetível, podendo o herbicida no biótipo resistente ter sido translocado e exsudado pelas raízes (JUGULAM et al., 2013).

Além disso, foram reportados que a aplicação de herbicidas auxínicos estimulam a biossíntese de etileno em plantas sensíveis, mas não em plantas resistentes. Essa resposta regulada de auxina e a hiperacumulação de etileno, ácido abscísico e espécies reativas de oxigênio em biótipos suscetíveis podem estar envolvidos na indução de dano tecidual e morte celular após aplicação de auxinas sintéticas (ROMERO-PUERTAS et al., 2004). A rápida resposta fisiológica foi recentemente observada como mecanismo de resistência de *Conyza sumatrensis* ao herbicida 2,4-D. As plantas após aplicação do herbicida apresentam morte celular dos tecidos foliares minutos após a aplicação do herbicida e após 10 dias a aplicação são observadas emissão de novas folhas nos meristemas (QUEIROZ et al., 2020).

O herbicida glifosato é amplamente utilizado no mundo devido ao seu amplo espectro e extrema eficiência sobre plantas suscetíveis. Entretanto, devido ao uso excessivo deste herbicida, em especial no sistema Roundup Ready® (RR®), já existem diversos casos de plantas daninhas resistentes a este herbicida (POWLES, 2008). O herbicida glifosato é não seletivo, inibidor da EPSPs, ao qual bloqueia a síntese de compostos principais na via do ácido chiquímico, resultando em redução do crescimento e impedindo a síntese de aminoácidos essenciais (NANDULA, 2007; GONZÁLEZ-TORRALVA et al., 2012). Possui a capacidade de translocar na planta para os meristemas apicais, raiz e órgãos reprodutivos (SHANER, 2009). Diversos mecanismos de resistência a este herbicida já foram relatados para o gênero *Conyza*, entre eles sequestro do herbicida no vacúolo, onde pode permanecer indefinidamente ou ser liberado lentamente a uma taxa sub-letal (GE et al., 2010; GE et al., 2011) e redução da translocação (SHANER, 2009).

Identificar os casos de resistência, bem como elucidar os mecanismos envolvidos na evolução da resistência é de fundamental importância para traçar estratégias de manejo, visando a redução da pressão de seleção, e a prevenção da resistência. É importante salientar que as estratégias de prevenção e manejo só serão totalmente eficientes quando usadas de forma combinada. O manejo integrado das plantas daninhas é considerado a principal ferramenta para reduzir o impacto ambiental, tornando o cultivo desfavoráveis as plantas daninhas. Nesse cenário, é de extrema importância elucidar o mecanismo de resistência do biótipo de *Conyza sumatrensis*, com resistência múltipla a cinco mecanismo de ação, visando propor melhor manejo para controle desta espécie no campo.

2.3 Resistência de plantas daninhas a herbicidas

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é a capacidade natural e herdável de alguns biótipos sobreviverem e terem a capacidade de reproduzir após exposição à dose de um herbicida, que seria letal para uma população normal de mesma espécie; sendo este um processo

evolutivo das plantas (CHRISTOFFOLETI & LÓPEZ-OVEJERO, 2003). Atualmente existem no mundo 515 casos de plantas daninhas resistentes, registrados em 97 cultivos em 72 países a 165 herbicidas diferentes, aumentando o número de casos a cada ano (HEAP, 2022). No Brasil existem 53 relatos de resistência em 28 espécies de plantas daninhas; sendo 9 desses relatos para o gênero *Conyza* (HEAP, 2022). O que torna ainda pior o cenário é o fato de que os biótipos resistentes podem apresentar resistência cruzada e resistência múltipla a herbicidas. No Brasil dos 9 casos de *Conyza* spp. resistentes, três apresentam resistência múltipla (HEAP, 2022).

Por definição, a resistência cruzada é a capacidade de um indivíduo resistente sobreviver a dois ou mais herbicidas de diferentes classes químicas, porém pertencentes ao mesmo mecanismo de ação, como observado na espécie *Leptochloa chinensis*, com resistência cruzada aos herbicidas cialofope, metamifop, fenoxapropo do grupo químico ariloxifenoxipropanoatos (FOPs), setoxidim do grupo químico ciclohexanodionas (DIMs) e ao pinoxadem do grupo químico das Fenilpirazolininas (Den's) pertencentes ao mecanismo de ação Inibidor da ACCase (YUAN et al., 2021).

Para *Conyza canadensis* a resistência cruzada foi encontrada aos herbicidas Inibidores da ALS, o biótipo apresentou resistência cruzada aos herbicidas cloransulam do grupo químico das triazolopirimidinas, clorimuron do grupo químico das sulfoniluréias, imazetapique grupo químico das imidazolinonas, bispiribaque do grupo químico dos pirimidinil(tio)benzoatos (ZENG et al., 2011). Resistência cruzada também foi encontrada em *Conyza sumatrensis* resistente aos herbicidas clorimuron e cloransulam, do grupo químico das triazolopirimidinas e sulfoniluréias, respectivamente, pertencentes ao modo de ação inibidores da ALS (SILVA et al., 2022).

A resistência múltipla, ocorre quando um biótipo possui resistência há mais de um mecanismo de ação (TRANDEL et al., 2011). Como o caso da espécie em estudo resistente a 5 diferentes mecanismos de ação, sendo estes Inibidor do Fotossistema I (FSI), Inibidor do Fotossistema II (FSII), Mimetizador de Auxina (Auxinic), Inibidor da 5-enolpiruvilshiquimato-3-fostato sintase (EPSPs) e Inibidores da Protoporfirinogênio IV oxidase (PROTOX) (PINHO et al., 2019). A resistência é o resultado da adaptação evolutiva das plantas daninhas a aplicação de herbicidas e estão envolvidas em duas categorias, mecanismo de resistência relacionado ao sítio-alvo (TSR) e mecanismo de resistência não relacionado ao sítio-alvo (NTSR) (DÉLYE et al., 2013).

O mecanismo de TSR, incluem alterações no gene que codifica a proteína-alvo ou alterações estruturais no sítio de ligação do herbicida, que causa uma redução na eficácia da ação direta do herbicida no seu alvo. As alterações podem causar um aumento na expressão ou na atividade inerente da proteína alvo do herbicida que compensa a ação inibitória do herbicida ou uma redução na afinidade do herbicida pelo seu alvo (DÉLYE, 2013). Como relatado para o biótipo de *Echinochloa crus-galli*, com substituição da Ala-122-Asn (PANOZZO et al., 2017), o mesmo mecanismo foi observado em *Amaranthus palmeri*, onde houve a substituição dos aminoácidos Ala-122-Ser (LARRAN et al., 2017). Por meio de análises genéticas e moleculares de genes e proteínas em biótipo resistente de *Amaranthus palmeri* foi demonstrado que a amplificação do gene EPSPS é o mecanismo de resistência ao herbicida glifosato (GAINES et al., 2010).

O mecanismo NTSR, pode ser devida a qualquer um ou uma combinação de mecanismos que limitam a quantidade de herbicida que atinge um local alvo, onde estão incluídas, redução da absorção e translocação do herbicida, aumento das taxas de sequestro de herbicidas na planta (GAINES et al., 2010), como observado nos biótipos de *Conyza bonariensis* e *canadensis* resistentes aos herbicidas glifosato e paraquat, os biótipos resistentes apresentaram redução da translocação para ambos os herbicidas, os autores supõem que o sequestro dos herbicidas no vacúolo também podem estar envolvidos na resistência (MORETTI, et al., 2016) e rápida necrose de folhas maduras, podendo resultar em redução da

translocação (ROBERTSON et al., 2010; LESPÉRANCE et al., 2016). Estes mecanismos agem reduzindo a quantidade de herbicida que atinge ao local alvo (POWLES & YU, 2010).

2.4 Morte celular

O estresse pode ser entendido como qualquer condição desfavorável que influencie o metabolismo, crescimento ou desenvolvimento de uma planta por alterar o seu equilíbrio homeostático impedindo a planta de alcançar seu potencial genético pleno. (KRANNER et al. 2010; TAIZ et al., 2017). Muitos são os tipos de estresses que as plantas podem ser expostas, sendo estes classificados como bióticos e abióticos. O estresse pode ser biótico, quando imposto por outro organismo, ou abiótico, decorrente de alterações químicas ou físicas do ambiente como oscilações de temperatura, umidade, radiação solar, deficiência nutricional, intoxicação por herbicidas, fungicidas e inseticidas, dentre outros (KRANNER et al., 2010).

De acordo com o estresse sofrido as células podem apresentar diferentes comportamentos. Em níveis baixos de estresse as células se aclimatam ao estresse e permanecem vivas; em níveis moderados de estresse, as células desencadeiam um programa de morte celular e, a níveis extremos de estresse as células ficam sobrecarregadas e a morte ocorre de forma descontrolada (necrose) (DAUPHINEE et al., 2014). Portanto a morte celular ocorre através de duas maneiras: necrose e morte celular programada.

Todos os organismos eucarióticos, incluindo plantas, animais e fungos, desenvolveram mecanismos de suicídio celular que coletivamente são conhecidos como morte celular programada (PCD) (TAIZ et al., 2017). Nas plantas a PCD desempenha um papel importante em seu desenvolvimento, e pode ser iniciada por sinais do desenvolvimento específicos ou por eventos potencialmente letais, como ataque de patógenos, exposição a herbicidas ou erros na replicação do DNA durante a divisão celular (GUNAWARDENA, 2008; DICKMAN et al., 2017; CONWAY & MCCABE, 2018). Isto é particularmente importante para as plantas devido à sua natureza sésstil, que impede a fuga física de condições ambientais adversas (KABBAGE et al., 2017).

A PCD nas plantas pode ser definida por sua função, ocorrência e características morfológicas e bioquímicas (VAN HAUTEGEM et al., 2015). Podendo ser organizadas em: resposta de hipersensibilidade (tipo RH), morte celular vacuolar (autolítica), morte celular necrótica (não autolítica) (VAN DOORN et al. 2011; MININA et al., 2014; TAIZ et al., 2017) e morte celular de plantas semelhante à apoptose (apoptosis-like programmed cell death (AL-PCD)) (MAGHSOUDI Et al., 2012; REAPE & MCCABE, 2010, 2013; DICKMAN et al., 2017).

A PCD do tipo resposta de hipersensibilidade (RH) é um mecanismo de defesa vegetal comumente observado em casos de ataque microbiano. Durante a resposta de hipersensibilidade em folhas, as células no entorno imediato do local de infecção cometem suicídio. Independente dos tipos de PCD-RH, a autólise não é iniciada pela expansão e pelo vazamento vacuolar. Em vez disso, a perda de água vacuolar e a contração celular são os primeiros eventos da PCD do tipo RH, seguidas pela degradação do DNA nuclear. A célula continua a se contrair devido à perda de água, e as organelas celulares e a membrana plasmática decompõem-se, liberando seus conteúdos no apoplasto (REAPE et al. 2008 ; TAIZ et al., 2017)

A morte celular vacuolar ocorre durante estresses abióticos e durante o desenvolvimento normal e reflete o fato de que o vacúolo central é o principal repositório de proteases, nucleases e outras enzimas líticas (MININA et al., 2013). O englobamento do material citoplasmático pelo o vacúolo está associado à morte celular vacuolar (VAN DOORN et al. 2011; MININA et al., 2014). Sendo muitas vezes manifestada por uma diminuição gradual no volume do citoplasma e um aumento concomitante no volume ocupado pelos vacúolos líticos (VAN DOORN et al. 2011; TAIZ et al., 2017). O vacúolo dilata-se e torna-se permeável ou rompe-

se, liberando hidrolases dentro do citosol e causando degradação em grande escala. O citosol e todas as suas organelas, incluindo a membrana plasmática, são completamente decompostos e, em muitos casos, a parede celular é parcial ou completamente digerida (TAIZ et al., 2017). A morte celular vacuolar pode ser regulada pelo EROS, pois o radical oxigênio causa diretamente a permeabilização da membrana vacuolar e a liberação de proteases e sua consequente ligação com a via de inibição irreversível em células levando à PCD (SAVVATEEVA et al., 2015).

A apoptose é um dos maiores tipos de morte celular encontradas em animais, quando comparada os outros tipos de morte celular (autofagia e necrose), suas alterações são muito bem compreendidas tanto em sua morfologia e bioquímica. A apoptose é acompanhada pela redução do volume celular, condensação da cromatina, segmentação nuclear e muito pouca modificação ultraestrutural das organelas citoplasmáticas. Sua característica principal é a formação da membrana plasmática que mantém sua integridade até os estágios finais da apoptose seguida pela fragmentação da célula em parcelas menores chamadas corpos apoptóticos. Finalmente, os corpos apoptóticos são englobados por fagócitos (KROEMER et al., 2009).

As células vegetais diferem fundamentalmente das células animais por serem envolvidas por rígidas paredes celulares. As plantas não possuem fagócitos e as paredes celulares bloqueiam o englobamento e a remoção de células apoptóticas por células adjacentes. Além disso, as caspases que são as principais proteases responsáveis pela execução da apoptose na célula animal, estão ausentes nas plantas. Porém, durante a PCD da planta, a atividade semelhante à caspase pode ser detectada e é atribuída às famílias alternativas de proteases, que incluem as metacaspases e enzimas de processamento vacuolar (VPEs) que desempenham um papel importante na remoção de células vegetais indesejadas ou desnecessárias (HARA E HATSUGAI et al., 2011; DICKMAN et al., 2017).

Uma vez que a PCD de uma planta, incluindo todas essas marcas, não foi identificada, a apoptose em seu sentido pleno não ocorre em plantas (VAN DOORN, 2011; VAN DOORN *et al.*, 2011; KABBAGE et al., 2017; LOCATO & DE GARA, 2018). No entanto, o termo "morte celular semelhante a apoptose" (Apoptosis like- Programmed cell death (PCD)) indica casos de PCD em plantas que mostram algumas características comuns à apoptose animal. Vários autores basearam-se na classificação de morte celular de plantas semelhante à apoptose (MAGHSOUDI et al., 2012; REAPE & MCCABE, 2010, 2013; DICKMAN et al., 2017), onde o morfotipo PCD que ocorre tipicamente em culturas de células vegetais submetidas a estresses abióticos é semelhante a apoptose devido à presença de encolhimento do citoplasma, condensação da cromatina e ruptura dos núcleos.

Durante a morte celular relacionada ocorre à resposta de desenvolvimento, hipersensibilidade (REAPE et al. 2008) e sobre estresses e é endogenamente controlada, dependente de energia (VAN HAUTEGEM et al. 2015). A PCD semelhante a apoptose é um processo organizado e dependente da energia em resposta a estímulo, em contraste com a necrose tem sido descrita como uma forma descontrolada de morte celular quando as células são sobrecarregadas por um estressor. Agentes que causam PCD também podem causar necrose, e a distinção entre as duas formas de morte celular é depende da gravidade do estresse (REAPE Et al., 2008; DAUPHINEE et al., 2014).

A morte celular necrótica foi definida como um tipo de morte celular que necessita das características de apoptose e autofagia (GOLSTEIN & KROEMER, 2007). É um modo rápido de morte de celular em plantas e, envolve a disfunção da mitocôndria e perda precoce da integridade da membrana plasmática (Van Doorn et al., 2011, MININA et al., 2013). A necrose é tipicamente uma resposta aguda de morte celular que se desenvolve rapidamente e leva vários minutos até um dia, como visto no RH, é uma resposta típica das plantas ao estresse abiótico e ataque de patógenos (VAN DOORN et al., 2011).

Marcas citológicas nos permitem diagnosticar a necrose e distingui-la de PCD: disfunção mitocondrial, que pode ser visualizada pela permeabilização da membrana

mitocondrial e pela morfologia inchada da mitocôndria, ausência dos vacúolos líticos em crescimento e uma ruptura precoce da membrana plasmática levando ao encolhimento do protoplastos são facilmente detectados em células necróticas (SCOTT & LOGAN, 2007; VAN DOORN et al. 2011; MININA et al., 2013). Como não há vacúolos líticos que limpam o citoplasma durante a necrose, os cadáveres de células necróticas permanecem em grande parte não processados. Um protoplasto encolhido é uma das características mais facilmente detectadas das células necróticas das plantas.

Caso, semelhante ao biótipo de *Conyza sumatrensis*, em estudo, foi observado para o biótipo de *Ambrosia trifida* L., resistente ao glifosato. O biótipo resistente de *Ambrosia trifida* apresenta rápida resposta quando submetida ao herbicida glifosato, onde as lesões começam a aparecer em folhas maduras aproximadamente 6 horas após o tratamento (VAN HORN et al., 2017; HARRE et al., 2017). Depois de 2 dias, as folhas maduras tornam-se inteiramente necróticas, enquanto as folhas mais novas, recentemente desenvolvidas permanecem intactas e a planta reestabelece o crescimento normal dentro de aproximadamente uma semana (MORETTI et al., 2017; HARRE et al., 2017; VAN HORN et al., 2017; VAN HORN et al., 2018). Em função da resposta rápida da planta sob a aplicação do herbicida, seguida da morte do tecido, ocorre a redução da translocação do glifosato na planta (MORETTI et al., 2017).

Através da microscopia eletrônica de transmissão notou-se diferença na morfologia celular entre o biótipo resistente e suscetível (LESPÉRANCE et al., 2016). O biótipo de *Ambrosia trifida* resistente apresenta a morte celular organizada semelhante apoptose (LESPÉRANCE et al., 2016). Enquanto no biótipo suscetível nota-se uma morte celular desorganizada e caótico, assemelha-se a uma necrose (LESPÉRANCE et al., 2016). Neste processo, parece que a integridade da parede celular foi perdida e a membrana plasmática rompeu, liberando o conteúdo da célula no espaço extracelular (LESPÉRANCE et al., 2016).

2.5 Absorção e translocação de herbicidas

A absorção dos herbicidas pelas plantas deve ocorrer após a sua interceptação e a retenção de gotículas. A absorção pode ocorrer pelas partes aéreas, raízes, estruturas jovens da planta, sendo esta dependente da forma que será aplicado o herbicida. A absorção foliar envolve a absorção do herbicida pela planta por organismos específicos que não são projetados para absorção de substâncias (MACHADO et al., 2009). Para uma absorção foliar eficaz deve haver a passagem do herbicida por três barreiras: camada cuticular, parede celular e plasmalema (KOHLENER et al., 2004). A passagem pela camada cuticular e a parede celular acontece por difusão, movimento concomitante a um gradiente de concentração; e pelo plasmalema por processo ativo, o qual é dependente de energia (TAIZ & ZEIGER, 2010).

A cutícula é a principal via de absorção dos herbicidas aplicados em pós-emergência, a qual possui fundamental importância nos estudos de absorção. Formada por cutícula secundária (capa cutinizada), cutícula primária com ceras embebidas e, na parte mais externa, as ceras epicuticulares (MONQUERO et al., 2004). A cutícula recobre todas as células da epiderme da planta, servindo como interconexão entre a planta e o ambiente; realizando a proteção, a prevenção da perda de água pela transpiração das plantas (BUKOVAC et al., 1990), e funcionando também como a barreira primária a absorção dos herbicidas. Porém para que os herbicidas foliares sejam ativos, eles devem ser capazes de penetrar na cutícula e, posteriormente, entrar na célula (DITOMASO, 1999). Herbicidas podem atravessar a cutícula com maior ou menor dificuldade isso vai depender de sua estrutura e molaridade. A permeabilidade do herbicida também irá depender da estrutura, composição da cutícula e estágio de desenvolvimento da planta (POWLES & YU, 2010).

Outra característica de superfície foliar que tem sido atribuída a suscetibilidade das plantas daninhas a herbicidas, são os tricomas, uma vez que podem influenciar na interceptação,

distribuição e absorção (DITOMASO, 1999; VARGAS et al., 1999). As folhas das plantas podem ter uma variedade de tricomas, que podem reduzir a eficácia do herbicida ao interceptar as gotas antes de entrar em contato com a superfície epidérmica (HESS, 1990). Dependendo da complexidade e da quantidade de tricomas, o número de gotas da pulverização que atingem a superfície da folha, podem reduzir o contato do herbicida com a cutícula.

A grande densidade de tricomas da superfície adaxial foi considerada uma das barreiras foliares a penetração do herbicida em *Conyza bonariensis* (PROCÓPIO et al., 2003). Resultados semelhantes foram obtidos quando avaliaram quatorze genótipos de tomate e obtiveram uma correlação inversa entre a atividade de acifluorfen e a frequência de tricomas, quanto maior a quantidade de tricomas, menor foi a atividade do herbicida. No mesmo estudo, também foi detectada uma direta correlação entre frequência de estômatos e sensibilidade ao acifluorfen (RICOTTA & MASIUNAS, 1992).

A maior absorção de herbicidas por espécies suscetíveis tem sido associada a presença de estômatos e tricomas (WYRILL & BURNSIDE, 1976; KING & RADOSEVICH, 1979). O estômato é normalmente constituído por um poro elíptico, encontrado na epiderme adaxial e/ou abaxial das folhas. O número e a abertura estomática podem exercer influência sobre a penetração dos herbicidas, principalmente quando estão presentes também na epiderme adaxial e abaxial da folha (SILVA et al., 2001), como é o caso da *Conyza* spp. Os estômatos das espécies *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* são anomocíticos, ou seja, não apresentam células subsidiárias diferenciadas. No entanto, para ocorrer movimento do herbicida através do ostíolo aberto para dentro da câmara estomática e deste para o citoplasma das células, seria necessária uma diminuição drástica da tensão superficial da gota pulverizada (INÁCIO et al., 2013). Sendo assim, a absorção via estômato não pode ser considerada meio eficiente de absorção de herbicidas, uma vez que depende da tensão superficial do líquido, do ângulo de contato produzido pelo líquido na superfície da planta e da morfologia e química da parede do poro do estoma (BUKOVAC, 1993).

Assim o conhecimento sobre a anatomia foliar das plantas daninhas contribui com informações sobre a estrutura foliar, que podem estar diretamente relacionadas com a diferença da absorção dos herbicidas. A redução da absorção, apesar de ser importante, não é um mecanismo NTSR comum, quando esta ocorre, geralmente, é apenas um fator que contribui para o mecanismo geral de resistência (GAINES et al., 2020). Como no caso do biótipo resistente de *Amaranthus tuberculatus*, onde a resistência ao herbicida glifosato foi devida tanto a redução da absorção quanto a alteração ao sítio alvo (NANDULA et al., 2013).

Após a absorção, o herbicida deve ser translocado para dentro da planta. Para herbicidas de ação sistêmica, a translocação para os pontos de crescimento da planta é essencial. Se a translocação do herbicida for impedida ou interrompida por qualquer fator, a eficiência no controle será significativamente reduzida (DUKE & POWLES, 2008). O mesmo acontece para herbicidas de contato, que possuem translocação limitada dentro da planta, é importante que haja uma quantidade de herbicida suficiente para que atinja o alvo e interrompa a função dentro da planta (SHANER, 2009). A absorção diferencial e a translocação reduzida foram relacionadas com diferentes herbicidas, sendo estas a base para resistência de algumas espécies avaliadas (REY-CABALLERO, et al., 2016).

O movimento de solutos dentro das plantas ocorre principalmente por duas vias. Uma rota é através do apoplasto e inclui o transporte em curtas distâncias, através dos espaços intercelulares e em longas distâncias nos vasos do xilema, sendo este transporte acropetal (direção ascendente). A segunda via é através do simplasto e inclui transporte célula a célula de curta distância através de plasmodesmos e transporte de longa distância nas células crivadas do floema, sendo este transporte ascendente e descendente para os locais de crescimento (basipetal) (DEVINE et al. 1993).

O transporte dos herbicidas a curtas distâncias, da superfície da raiz para o xilema, ocorre quando estes precisam penetrar algumas camadas das células para atingir o seu destino. Este tipo de transporte é característico de herbicidas de contato, como inibidores de crescimento pré-emergentes ou inibidores de fotossíntese pós-emergentes (HESS, 2018). A via pode ser simplástica da epiderme ao xilema, porém o xilema é um sistema apoplástico e o herbicida deve deixar o simplasma neste local. O movimento do herbicida pode ser apoplástico da epiderme para a endoderme, mas a endoderme contém área onde as paredes são impregnadas com suberina, sendo esta uma barreira que limita o movimento apoplástico. A suberina é uma mistura complexa de substâncias lipofílicas; principalmente ácidos graxos e álcoois de cadeia longa e compostos fenólicos, denominada Estrias de Caspary (ALBIERO et al., 2005). Por causa dessa faixa, água e substâncias dissolvidas devem entrar no simplasto neste local na raiz. A estria de Caspary não é uma significativa barreira para os herbicidas sendo estes capazes de penetrar prontamente no plasmalema. Uma vez dentro da camada endodérmica, o herbicida pode se mover para a superfície do xilema no apoplasto ou no simplasto (ALBIERO et al., 2005).

O transporte de herbicidas a longa distância é de extrema importância, para herbicidas pós-emergente de ação sistêmica, quando o objetivo é controlar plantas já estabelecidas e além do estágio de plântula. Em casos em que translocação não ocorre de maneira adequada a planta daninha não é totalmente controlada e é capaz de rebrotar. Quando o herbicida não fica retido nas folhas ou raízes, e estará disponível para o transporte a longas distâncias através do floema e xilema (NEUMANN, 1988). O xilema é uma rede contínua de células que se estende desde a zona de pêlos radiculares (zona de diferenciação) de todas as raízes até todas as folhas maduras e em desenvolvimento. O principal objetivo do xilema é a translocação de seiva xilemática, água e solutos das raízes para as folhas (GUERREIRO et al., 2006).

No xilema a água se move em relação a dois mecanismos. Em plantas pequenas, sob alta umidade do solo e alta umidade relativa, a água pode se mover como resultado da pressão das raízes. Em plantas grandes, o mecanismo de movimento ascendente depende da tração resultante da perda de água das folhas durante a transpiração, com a água nos ductos do xilema sendo puxada pelo caule sob tensão ou pressão negativa, teoria proposta por H. Dixon, 1914 (KERBAUY, 2008). Sendo este mecanismo o mais comum processo de transporte da água e substâncias dissolvidas. Neste caso, o movimento dos herbicidas, será em direção ao potencial hídrico mais negativo, que neste caso é a superfície de evaporação da folha, já que este encontra-se dissolvido na solução (SICBALDI et al., 1997).

A maioria dos herbicidas apresentam mobilidade no xilema, devido ao fluxo de massa de massa de águas e substâncias dissolvidas no xilema e a aparente difusão dos herbicidas através do plasmalema na endoderme (CAYLEY, 1980). Porém alguns herbicidas não apresentam essa mobilidade, pois é provável que muitos herbicidas sejam incapazes de cruzar plasmalema na endoderme; os herbicidas podem ser compartimentalizados, podem se conjugar a substâncias que não são móveis no xilema, entre outros (SICBALDI et al., 1997).

O tecido do floema das plantas é composto principalmente pelos elementos crivados, células companheiras e o parênquima do floema. No floema, os produtos gerados pela fotossíntese são translocados do seu local de síntese, denominado fonte, para um local de metabolismo ou de reserva, denominado dreno. As fontes referem-se aos órgãos fotossintéticos da planta, capazes de produzir fotoassimilados além da sua demanda energética. Já os drenos são caracterizados por órgãos não fotossintéticos e que não produzem fotoassimilados suficientes para a sua demanda de crescimento ou reserva, havendo a necessidade de importação de carboidratos (TAIZ et al., 2017).

A teoria aceita para o transporte no floema é baseada no fluxo de pressão de Münch, onde o movimento de água, açúcares e outros compostos como aminoácidos e íons inorgânicos através do floema é ocasionado devido ao carregamento ativo de açúcares nos elementos

crivados do floema por células companheiras. A alta concentração de açúcares no floema faz com que o potencial de água no tecido diminua, de modo que a água entra pelo xilema e cria um gradiente de pressão que empurra a água das folhas de origem para os órgãos drenos (SCHEPPER et al., 2013).

Para herbicidas a mobilidade no floema, permite que os herbicidas aplicados nas folhas, movimente-se passivamente, seguindo a direção do fluxo dos solutos, atingindo todas as partes da planta (DENIVE et al., 1993). Porém as algumas características químicas das moléculas herbicidas influenciam a translocação no floema, como a lipofilicidade e a presença de grupos ionizáveis (KLEIER E HSU 1996). A alternância de camadas aquosas e oleosas impõe dificuldades na absorção, tanto para os herbicidas hidrofílicos como para os lipofílicos. Os herbicidas com melhor/maior movimentação na planta apresentam comportamento intermediário entre esses extremos. A afinidade do herbicida pelas camadas aquosas e oleosas é definida pelo K_{ow} que é o coeficiente de partição do herbicida que indica a afinidade por compostos orgânicos ou sua lipossolubilidade (VITTA et al., 2004) A penetração de compostos hidrofílicos poder ser melhorada pela hidratação da cutícula, enquanto o transporte transcuticular de solutos não polares é aumentado por fatores que reduzem a viscosidade de ceras (KIRKWOOD, 1999).

A maioria dos herbicidas pós-emergentes são ácidos fracos e estes podem mover-se através da membrana plasmática, contra um gradiente de concentração. No geral, acredita-se que a absorção através da membrana por difusão simples é maior em pH mais baixo, devido à alta proporção de moléculas presentes na forma não-dissociada, estes são acumulados em células por um meio de captura de íons dependente de energia (LIU, 2002; STRERLING et al., 1990), esse comportamento é definido como armadilha iônica. Como o pH do exterior celular está ao redor de 5,5, as moléculas dos herbicidas ácido-fraco estão na forma não-dissociada e são capazes de penetrar na célula mais facilmente.

Ao entrarem no citoplasma, onde o meio é mais alcalino (pH próximo a 7,5), dissociam-se e adquirem a forma mais ativa de sua molécula e menos passível de transporte. As moléculas do herbicida ficam "presas" no citoplasma, pois a forma dissociada é menos capaz de se difundir para o exterior (VIDAL, 2002). Sendo assim, herbicidas ácidos fracos fora do citoplasma, estarão sempre na sua forma molecular o que facilita o seu transporte pela membrana celular, ao entrar no citoplasma as moléculas estarão ionizadas, devido ao aumento do pH, dificultado a sua passagem pela membrana (BROMILOW et al., 1990). Existem herbicidas que não são ácidos fracos e são translocados pelo floema, sendo a permeabilidade estimada pelo K_{ow} (BROMILOW et al., 1990).

Tendo em vista a importância da absorção e translocação para a eficácia dos herbicidas, qualquer alteração nas plantas pode reduzir a quantidade de moléculas que vão atingir o sítio alvo, tornando o controle ineficaz. Mecanismos que retêm o herbicida nas folhas ou que impedem seu movimento para os pontos de crescimento por meio de barreiras nas membranas reduzem a quantidade de herbicida que deve ser translocado gerando assim a resistência. Além disso, a translocação reduzida pode ser resultado de outros mecanismos NTSR, como foi descrito, para a espécie *Ambrosia trifida* resistente ao herbicida glifosato (MORETTI et al., 2018; VAN HORN et al., 2018). Nesta espécie, após a aplicação do herbicida ocorre a rápida necrose das folhas, e dias após a rebrota da planta pelos meristemas, sendo conhecido esse fenômeno como rápida necrose. Sintomas semelhantes ocorrem para a espécie em estudo após a aplicação do herbicida 2,4-D, sugerindo que a redução da translocação pode ser um dos mecanismos de resistência.

3 CAPÍTULO I

**ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS EM *Conyza sumatrensis* RESISTENTE
AO HERBICIDA 2,4-D**

**“STRUCTURAL CHANGES IN *Conyza sumatrensis* AS RESISTANCE
MECHANISM TO HERBICIDE 2,4-D”**

RESUMO

Este trabalho explora as mudanças anatômicas que podem estar relacionadas à resistência ao herbicida 2,4-D em *Conyza sumatrensis*. Os objetivos do trabalho foram analisar a diferença entre as estruturas dos tecidos de biótipos suscetíveis e resistentes de *Conyza sumatrensis* e suas alterações após o tratamento com herbicida 2,4-D. Duas análises foram realizadas. Para estudos anatômicos amostras de folhas foram coletadas aos 15 e 30 minutos após a aplicação do 2,4-D, e o material foi processado seguindo técnicas padrão em anatomia vegetal, examinado sob Microscopia de Luz e os resultados relevantes documentados usando um fotomicroscópio Olympus BX 41 equipado com um sistema digital. Para a caracterização micromorfológica, as folhas mais expandidas foram coletadas aos 30 min e 3 horas para biótipo resistente e suscetível, após a aplicação do herbicida 2,4-D, as amostras foram processadas e examinadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (Vega 3LMU Tescan, Brno, República Tcheca). Diferentes comportamentos foram observados em biótipos resistentes e suscetíveis após aplicação de 2,4-D. O biótipo resistente apresentou uma resposta particular. Em todos os tratamentos foi possível observar uma resposta rápida após a aplicação do 2,4-D. Aos 30 minutos de aplicação nas análises micromorfológicas e anatômicas foi possível observar fortes sinais de morte celular no mesofilo foliar, que aumentou ao longo do tempo. A ruptura das células do mesofilo impede que o herbicida atinja os feixes vasculares evitando a disseminação do herbicida em todo o tecido vegetal. As alterações estruturais nas folhas como rompimento de ceras, perda de turgescência, maior desnaturação da camada epidérmica culminando na formação de dobras na superfície adaxial podem contribuir para a resistência de *Conyza sumatrensis* ao herbicida 2,4-D. Os biótipo suscetível e resistente apresentaram uma estrutura foliar diferente que pode estar associada a um mecanismo de resistência; o biótipo resistente apresenta maior espessura de lâmina foliar, o que resulta em maior parênquima paliçádico, lacunoso e maior espaço intercelular. O biótipo resistente de *Conyza sumatrensis* com resposta fisiológica rápida, apresenta alterações estruturais 30 minutos após a aplicação do herbicida 2,4-D, e o dano aumenta em 3 horas após a aplicação. Essas alterações são destacadas pela ruptura das células do mesofilo, impedindo que o herbicida atinja os feixes vasculares evitando a disseminação do herbicida em todo o tecido vegetal.

Palavras-chave: epiderme, mecanismo de resistência, micromorfologia, buva, rápida necrose

ABSTRACT

This work explores anatomical changes that could be related to the resistance 2,4-D herbicide in *Conyza sumatrensis*. The aims of the work were analyzing the difference between the structures of the susceptible and resistant tissues of *Conyza sumatrensis* and its changes after 2,4-D herbicide treatment. Two analyses were realized. For anatomical studies leaf samples were collected at 15 and 30 minutes after 2,4-D application, and the material was processed following standard techniques in plant anatomy, examined under Light Microscopy and the relevant results documented using a photomicroscope Olympus BX 41 equipped with a digital system. For micromorphological characterization, expanded leaves were collected at 30 min and 3 hours for resistant and susceptible biotype, after the 2,4-D herbicide application, the samples were processed and examined Scanning Electron Microscopy (Vega 3LMU Tescan, Brno, Czech Republic). Different behaviors were observed in resistant and susceptible biotypes after 2,4-D application. The resistant biotype showed a particular response. In all treatments were possible observed a rapid response after 2,4-D application. At 30 minutes of application in micromorphological and anatomical analysis was possible to observed strong signals cellular death in the leaf mesophyll, and it increased over time. The mesophyll cell rupture preventing the herbicide to achieve the vascular bundles avoiding herbicide spread in the whole plant tissues. It shows that the structural changes on the leaves as disruption of waxes, loss of turgor, higher denaturation of epidermal layer culminating in the formation of folds in the adaxial surface could contribute to resistant of *Conyza sumatrensis* to 2,4-D herbicide. The susceptible and resistant biotype showed a different leaf structure that could be associate with a resistant mechanism of resistance; the resistant biotype present larger leaf blade thicker, which reflect in larger palisade, spongy parenchyma layer and intercellular air spaces. The resistant biotype of *Conyza sumatrensis* with rapid physiology response, presents structural changes 30 minutes after 2,4-D herbicide application, and the damage increase at 3hours after application. These alterations are highlighted by the mesophyll cells rupture, preventing the herbicide to achieve the vascular bundles avoiding herbicide spread in the whole plant tissues

Keywords: anatomy, cellular rupture, mechanism of resistance, buva, rapid necrosis

3.1 INTRODUCTION

The convivence of weeds with a culture of interest can manifest itself directly, when they compete for resources essential to growth and development, such as water, nutrient, light, where the consequences will be on the yield and quality of the product. Also, indirectly, it will be affected as practices such as harvesting and processing grains. An infestation of only 12.2 m⁻² of *Conyza* in the soybean crop, coexisting from emergence to the harvest of the grain, was able to reduce productivity by 700kg ha⁻¹. Under conditions of infestation density of approximately 56 *Conyza* plants per m², the reduction in productivity reached 1500 kg ha⁻¹ (GAZZIERO et al., 2010).

To date, 20 cases of resistance to herbicides have been reported in *C. sumatrensis* (HEAP, 2022). In 2017, it was reported in Brazil a biotype that possessed multiple resistance to five mode of action, such as 5-enolpyruvyl-shiquime-3-phosphate synthase inhibitor, photosystem I inhibitors, photosystem II inhibitors, protoporphyrinogen oxidase inhibitors, including 2,4-D herbicides (PINHO et al., 2019), which this work is focused on.

Auxinic herbicide was the first to be discovered and employed in the agriculture. Due it, 45 cases of resistance to 2,4-D herbicide are already reported (HEAP, 2022). Although, the widespread use of the 2,4-D herbicide in weed control system, a low frequency of resistances was reported in comparison to other mode of action (WALSH et al., 2006). The 2,4-D herbicide promotes an unbalanced in plant homeostasis auxin, resulting in continuous expression of responsive genes in auxin, which increases ethylene as well as abscisic acid synthesis and reactive oxygen species. In addition, it leads to disordered growth, senescence and death (RAGHAVAN et al., 2006; MITHILA et al., 2011; GROSSMANN, 2010).

The resistant biotype of *C. sumatrensis* showed a differential response after 2,4-D application. The leaves that receive the herbicide presents dark spot that grow to necrosis in 4 hours after treatment (HAT). By 24 HAT the leaves were desiccated, and the plants looks death. By 10 days after treatment, the plant regrows through the axillary and apical buds (LEAL et al., 2022). Similar response was observed in *Ambrosia trifida* to glyphosate herbicide (VAN HORN et al., 2018).

Weed resistance for 2,4-D herbicide is usually associated with non-target resistance (GOGGIN et al., 2016). Differences between resistant and susceptible biotype to 2,4-D herbicides can be attributed to leaf anatomy, reduced absorption, differential translocation and metabolization of herbicides (GALVAN et al., 2012; TUFFI SANTOS et al., 2005). For *C. sumatrensis* no work has been conducted to clarify this issue.

Characteristics of leaf anatomy influences the herbicides absorption (JUGULAM & SHYAM, 2019). The absorption of the herbicide in the plant may be related to the leaf area, leaf position in relation to the spraying process. Besides, the presence of trichomes, epicuticular wax composition, cuticle thickness, parenchymatic cell thickness and its organization also effect the herbicide absorption. According to Hajri et al. (2016), in ryegrass biotypes the increase of wax coating on the leaf epidermis and cuticle led to resistance to ALS-inhibitor herbicide. In *Euphorbia heterophylla*, the cuticle thickness was associated to the resistance mechanism since it altered the absorption ALS-inhibiting herbicides (PLAZA et al., 2006).

To better understand the resistance mechanism presented in the resistant biotype of *C. sumatrensis* to the herbicide 2,4-D, this work aimed to compare resistant and susceptible biotype and analysis the leaf structural alterations in the susceptible and resistant biotype to the herbicide 2,4-D of *C. sumatrensis*, in order to clarify the mechanisms involved in the resistance. Our hypothesis is: resistant plants of *C. sumatrensis* present structural alterations when exposed to 2,4-D that allow them to regrow later.

3.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.1 Plant materials and growth conditions

Susceptible and resistant *C. sumatrensis* biotypes were cultivated in a greenhouse, under controlled conditions of light, temperature and humidity. Seeds were placed in plastic containers with 200 cells filled with commercial substrate. After germination, seedlings with two expanded leaves were transplanted to pots with a capacity of 0.35 L, filled with commercial substrate.

3.2.2 Anatomical and micromorphological Analysis

3.2.2.1 Herbicide application

Susceptible and resistant biotypes of *C. sumatrensis* with 10-12 leaves were submitted to the treatments. The 2,4-D (dichlorophenoxyacetic acid) was applied at a dose of 1005g a. e ha⁻¹. The treatments were sprayed using a CO₂-pressurized backpack sprayer equipped with four flat-fan nozzles (XR110015, TeeJet Technologies), which delivered 150 L ha⁻¹ of spray solution at 280 kPa, and at ground seep of 4.53 km h⁻¹.

3.2.2.2 Leaf structure - Light microscopy (LM)

For anatomical studies, resistant and susceptible leaves were collected from control and after 15 and 30 minutes (min) of 2,4-D application. The sampling was conducted in a completely randomized design, with four repetition (n = 24). The samples were fixed in FAA 50 (formaldehyde, acetic acid and 50 % ethanol; 1:1:18 vol/vol) (Johansen, 1940), dehydrated in alcoholic series and embedded in Leica historesin. Cross sections (4 µm thick) were obtained with a rotatory microtome and stained with toluidine blue O 0.05%, pH 4.7 (O'Brien et al., 1964). Slides were mounted with deionized water. The material was examined, and the relevant results documented using a photomicroscope Olympus BX 41 equipped with a digital system. Morphometric analyses to compare susceptible and resistant biotypes were performed using the ImageJ Software for Life Science Microscopy. The results were tested by one-way ANOVA, following by *t* test ($p \leq 0.05$) using the software Rbio (BHERING, 2017).

3.2.2.3 Micromorphological characterization – Scanning electron microscope (SEM)

To analyze the superficial alteration after 2,4-D application, we collected the central region from expanded leaves at 30 min and 3 h for and susceptible, in addition to samples of plants under control without treatment for both biotypes. The sampling was conducted in a completely randomized design, with four repetitions (n= 20 to resistant and n = 12 to susceptible). The samples were fixed overnight in Karnovsky's solution and vacuum-infiltrated (4% paraformaldehyde + 2.5% glutaraldehyde in 0.05 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2). After fixation, the samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide for 2 h and washed with sodium cacodylate buffer three times. Posteriorly, the samples were dehydrated with increasing ethanol series (15%, 30%, 50%, 70%), dried using the critical point method (K850 Critical Point Dryer, Quorum Technologies) and metallized with a 15 nm gold coating (Desk V Sample Preparation, Denton Vacuum). The images were observed and obtained using a scanning electron microscope (Vega 3LMU Tescan, Brno, Czech Republic).

3.3 RESULTS

3.3.1 Anatomical characterization

3.3.1.1 Leaf structure - Light microscopy

Susceptible and resistant *C. sumatrensis* leaves are amphistomatic, homobaric and present dorsiventral mesophyll (Figure 1 A). The epidermis is uniseriate, and the common cells present irregular size (Figure 1 A, B). Glandular and no glandular trichomes are present on both surfaces (Figure 1 B). The stomata are arranged at the same level as the common cells or protrude slightly (Figure 1 A). On both sides of the leaf blade, the epidermal cells are covered by a thin cuticle layer (Figure 1 A, B). The mesophyll is composed of a layer of palisade parenchyma and three to four layers of spongy parenchyma (Figure 1 A, B). Collateral vascular bundles with parenchymatous voluminous bundle sheath were observed immersed in the mesophyll (Figure 1 B). In the region of the midrib, the cortex is composed of four to five layers of voluminous parenchyma cells with regular contours (Figure 1 B). Secretory spaces are present close to the phloem in the midrib and small vascular bundles (Figure 1 A, C). Comparing the morphometric parameters from both analyzed biotypes several differences are evident (Tab. 1). Resistant biotype showed leaf blade thicker 6% than susceptible plants, which reflect in larger palisade and spongy parenchyma layer. The palisade and spongy parenchyma in resistant biotype are approximately 39% and 32% lengthier than susceptible plants. The same is observed in adaxial epidermis, when compared to susceptible approximately 39% is lengthier in resistant plants. Abaxial epidermis do not show difference between biotypes. In addition, resistant biotype presented intercellular air spaces 77% bigger than susceptible biotype (Tab. 1).

Table 1. Leaf blade characteristics of susceptible and resistant *Conyza sumatrensis* plants, including, mesophyll thickness, epidermal length (adaxial and abaxial surfaces), palisade parenchyma length, spongy parenchyma length and intercellular air spaces. Different *letters* indicate significant differences ($p < 0.05$) according to t test.

Characteristics	Susceptible	Resistant	P value	F value
Leaf blade thickness (μm)	122.8 b	173.1 a	0.003	44.1
Palisade parenchyma length (μm)	39.4 b	64.1 a	0.001	63.8
Spongy parenchyma length (μm)	67.5 b	99.2 a	0.001	72.1
Epidermal length – adaxial (μm)	15.4 b	25.3 a	0.00005	418.3
Epidermal length – abaxial (μm)	16.1 ns	16.9 ns	0.49	0.6
Intercellular air spaces (μm^2)	759.3 b	1343.1 a	0.0002	142.3

At 15 minutes after application, it was not possible to observe differences in resistant and susceptible biotypes. Concerning the treatments 30 min of application, the susceptible biotype showed leaf structure similar to the control (Figure 1 D), and the resistant biotype showed strong signals cellular death (Fig. 1 E, F, G). The palisade and spongy parenchyma showed collapsed areas (Figure 1 E, F), with protoplast rupture (Figure 1 F). No alteration was observed in the bundle sheath and in the vascular tissues, even when immersed in a complete collapsed parenchyma region (Figure 1 G). The midrib structure was not affected (Figure 1 E).

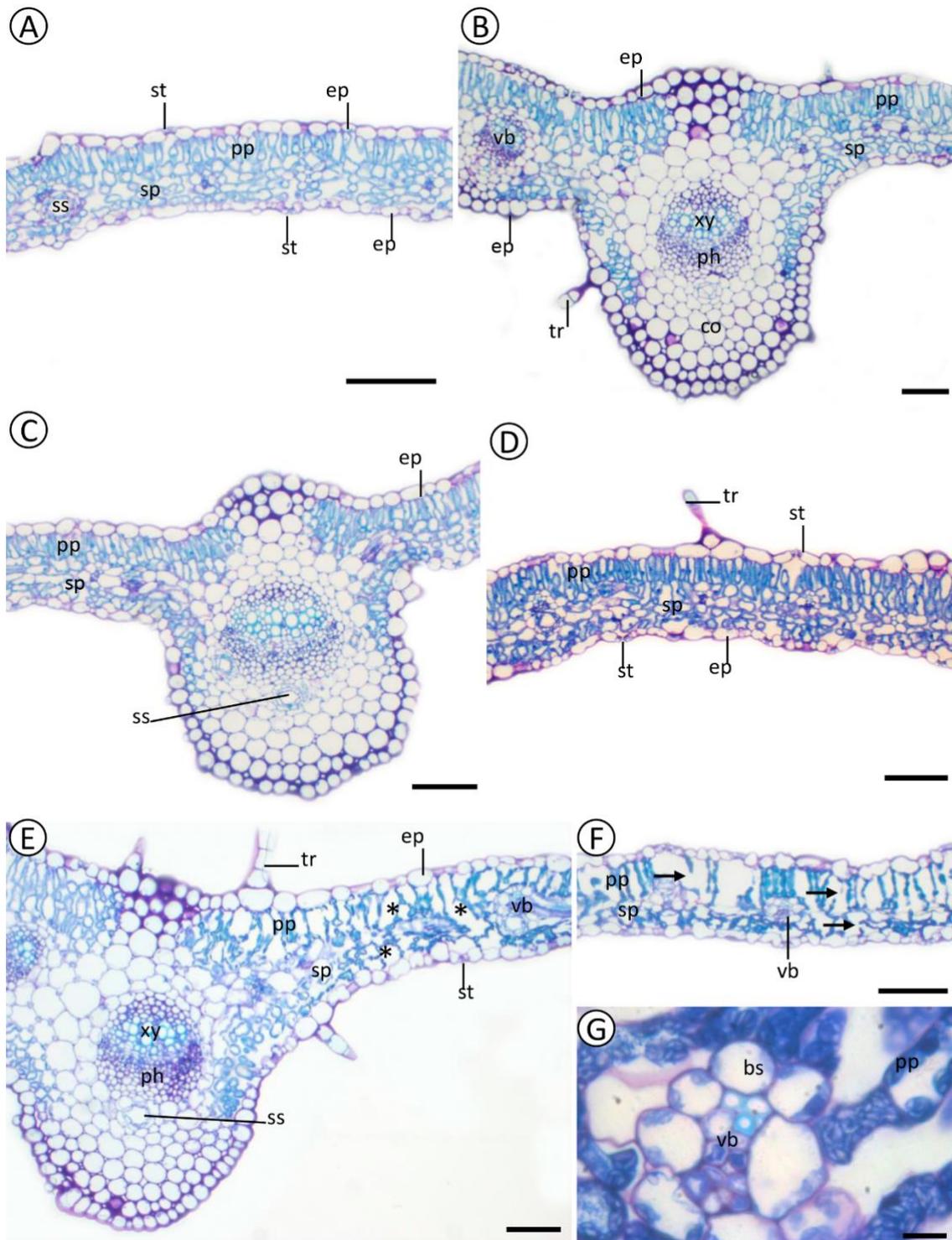


Figure 1. Photomicrographs of susceptible (A, C, D) and resistant (B, E, F, G) *Conyza sumatrensis* leaf blades under control (A, B), and submitted to 2,4-D herbicide and analyzed after 15 (C) and 30 (D, E, F, G) minutes. A, D Leaf blade showing epidermis with cells with irregular size, stomata on both surfaces, and mesophyll formed by palisade and spongy parenchyma. B, C Detail of midrib showing collateral vascular bundle and parenchymatous cortex. E General view of the leaf blade showing midrib with normal aspect and palisade and spongy parenchyma with collapsed areas (asterisk). F Detail of leaf blade showing ruptured cells (arrows) in the palisade and spongy parenchyma). G Detail of the vascular bundle immersed in a collapsed parenchyma showing bundle sheath with regular aspect. bs: bundle sheath, co: cortex, ep: epidermis, pp: palisade parenchyma, sp: spongy parenchyma, ss:

secretory space, st: stomata, tr = trichome, vb: vascular bundle, xy: xylem. Scale bars: A-F = 100 μ m; G = 10 μ m.

3.3.1.2 Micromorphological characterization

The resistant and susceptible biotypes of *C. sumatrensis* exposed to 2,4-D herbicide showed different behaviors on the leaves in ultrastructural analysis. In the resistant biotype under control, the epidermal cells showed regular shape with smooth cuticle (Fig. 2 A). After 30 minutes of 2,4-D application the ultrastructure of wax was affected. The leaf abaxial surface revealed little disruption of waxes (Fig. 2 B), the leaf surface shows loss of turgor that favored the higher denaturation of epidermal layer (Fig. 2 C). Over time, there is a progressive disorganization of the pattern of cells in the epidermis, resulting from necrosis, and culminating in the formation of folds in the adaxial surface (Fig. 2 D). This pattern can be related to plasmolyze epidermal cell as well as the mesophyll cells. Necrotic areas increase progressively, being more evident folds on epidermis after 3 hours application (Figs. 2 E, F). On the other hand, the leaves from susceptible biotype were not affected over time after the leaves had been exposed to 2,4-D herbicide (Figs. 2 G, H, I).

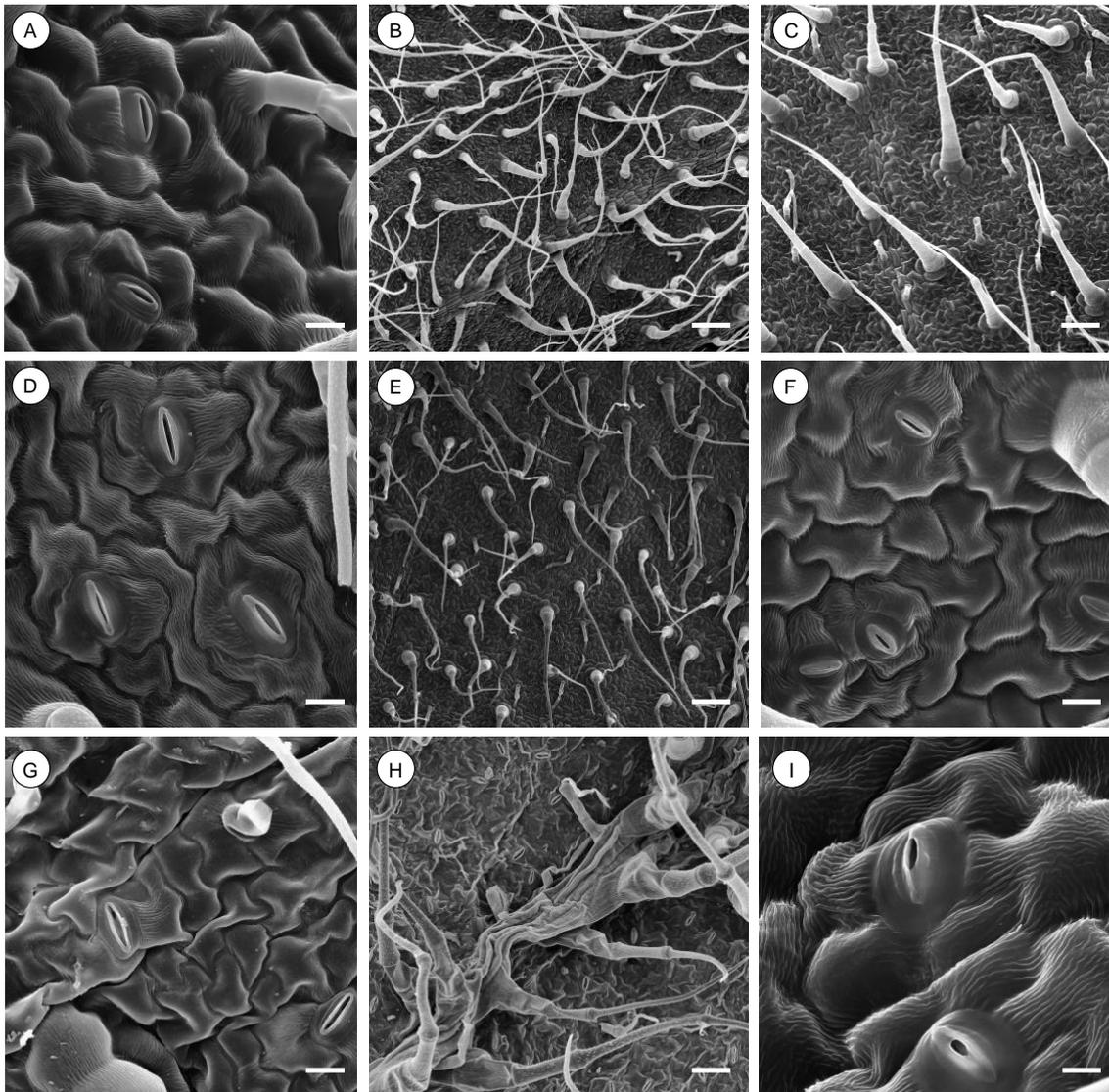


Figure 2. Electronmicrographs of *Conyza sumatrensis* leaf surfaces after 2,4-D application. (A, B, D, E, G, H) resistant biotype. (C, F, I) susceptible biotype. (A, D, I, F) Views from the

adaxial leaf surface. (B, C, E, G, H) Views from leaf surfaces. (A-B) Control. (D-E) After 30 min. (G-H) After 3 h. (C) Control. (F) After 30 min. (I) After 3 h. Scale bars: I = 10 μm , A; D; F; G= 20 μm , H= 100 μm ; B; C; E = 200 μm .

3.4 DISCUSSION

Several differences were observed in morphometric parameters between susceptible and resistant biotypes. Foliar differences that prevent the normal movement of the herbicide will reduce the total amount translocated, thus conferring resistance (GAINES et al., 2020). The increase of intercellular air spaces in the resistant biotype of *C. sumatrensis* may be reducing transport of 2,4-D herbicide. The main transport route for the 2,4-D herbicide is symplastic. The symplastic transport occurs through the interior of the cells through the plasmalemmas. These are responsible for the cytoplasmic connection between adjacent and main cells (CONCENÇO et al., 2007). Therefore, increase of intercellular spaces, reduces contact between cells, thus reducing the transport of the herbicide in resistant plants.

2,4-D herbicide affected the leaf structure in resistant biotype of *Conyza sumatrensis*. The progressive damage in resistant leaves start in 30 minutes and increase at 3 hours. Susceptible biotype, at 3 hours after application do not show symptoms. Is important to reflect that the rapid physiologic response, atypical symptoms, in resistant biotype is the first case, to date, to herbicide 2,4-D in *C. sumatrensis* (QUEIROZ et al., 2020). Plants have been adapted to abiotic stresses, and the response can be rapid and specific (ASHAPKIN et al., 2020), as cell death. Cell death is an important process for multicellular organisms, and can be divided in two categories, programmed cell death (PCD), and necrosis (HOTCHKISS et al., 2009; MUKHTAR et al., 2016). Necrosis is the progressive phenomenon that surveys with irreversible injury. PCD, such as apoptosis, in contrast, including development, and immune response for homeostasis preservation. Plants can use PCD to control pathogen invasion and infected cell population, as a systemic defense response (PITSILI et al., 2020; MUKHTAR et al., 2016). In this study, we suggest the application of 2,4-D herbicide induces the hypersensitive response in resistant biotype of *Conyza sumatrensis* such as a systemic defense to herbicide.

Similar response of the plants was observed to glyphosate herbicide in *Ambrosia trifida* the authors observed the symptoms within 6 hours after herbicide application. The symptoms start in mature leaves, and 24 hours after application all the mature leaves display similar leaf curling and total tissue desiccation and death (VAN HORN et al., 2018). Lesperancé (2006), working with the same resistant biotype of *Ambrosia trifida*, observed in resistant plants the apoptosis-like programmed cell death (AL-PCD). Significant amount of glyphosate is sequestered in the collapsed protoplasts of mature leaves via the rapidly AL-PCD occurring in the palisade and spongy parenchyma cells. If the 2,4-D is also captured by the protoplast of *C. sumatrensis* remains unknown; however, our results show similar damages.

In this study, we confirm our hypothesis, once that the cellular damage observed in the mesophyll cells (palisade and spongy parenchyma) in resistant biotype, is a process in response to 2,4-D herbicide. The rapid physiology response prevent translocation to the conducting tissues and being distributed to other parts of the plant. The control cellular suicide can be described hypersensitive response as an adaptation developed by the plants of *C. sumatrensis* to guarantee regrowth, and consequently enable the growth of the resistant population. On the other hand, the susceptible biotype did not present strong alternations, allowing the herbicide distribution in the whole plant. This phenomenon is what happens with several plant species controlled by 2,4-D. Control have been reported after 2,4-D application in susceptible biotype of *Conyza* spp. control higher than 90% was observed after 2,4-D in dose superior 646.02 g a.i. ha⁻¹ (SOARES et al., 2012). Leal et al. (2021) observed in susceptible biotype of *Conyza* spp. control after 2,4-D application at 1,005 g a.i. ha⁻¹.

Multiple mechanisms are involved in the differential response to the herbicide, such as anatomical changes in the leaves (GAINES et al., 2020). The morphometric difference of the

resistant and susceptible biotypes can be interpreted as structural adaptations to herbicide application. 2,4-D is a foliar herbicide, and its absorption by leaf cells would require not only to passage through the cell membrane but, at the same time, the penetration of the outer and inner epidermis cell wall, therefore, is conceivable that its leaf absorption can be affected by the structure of the leaf (PETERSON et al., 2016).

In addition, we must consider defenses mechanism to abiotic stress. Herbicide application can induct of reactive oxygen stress (ROS), which involve hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide radical (O_2^-), hydroxyl radical (OH^-), among others (CHOUDHURY et al., 2013). In this sense, Queiroz et al. (2020) showed to Marpr9-rn with rapid physiology response to 2,4-D, that after 15 minutes of application, the production of H_2O_2 and increase over time. Whether the 2,4-D application induces higher production of H_2O_2 , in resistant biotype of *C. sumatrensis* than in susceptible biotype are being conducted.

To this biotype, all the facts suggest the kind of death are associated PCD pathway. To elucidate with more conviction analysis of Transmission Electronic Microscopy are being developed.

3.5 CONCLUSION

The susceptible and resistant biotype showed a different leaf structure that could be associated with a resistant mechanism of resistance. The resistant biotype of *Conyza sumatrensis* with rapid physiology response, presents structural changes 30 minutes after 2,4-D herbicide application, and the damage increase at 3 hours after application. These alterations are highlighted by the mesophyll cells rupture, preventing the herbicide to achieve the vascular bundles avoiding herbicide spread in the whole plant tissues.

3.6 REFERENCES

- ASHAPKIN, V.V.; KUTUEVA L. I.; ALEKSANDRUSHKINA N. I.; VANYUSHIN B. F. Epigenetic mechanisms of plant adaptation to biotic and abiotic stresses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 20, p. 7457, 2020.
- BHERING, L.L. Rbio: A Tool for Biometric and Statistical Analysis Using the R Platform. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, p. 187-190, 2017.
- CHOUDHURY, S., PANDA, P., SAHOO, L., PANDA, S. K. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. **Plant signaling & behavior**, v. 8, n. 4, p. e23681, 2013.
- CONCENÇO, G., FERREIRA, E. A., FERREIRA, F. A., & SANTOS, J. B. Plasmodesmos: transporte simplástico de herbicidas na planta. **Planta Daninha**, v. 25, n. 2, p. 423-432, 2007.
- GAINES, T.A.; DUKE S. O.; MORRAN, S.; RIGON, C. A. G.; TRANEL, P. J.; KÜPPER, A.; DAYAN, F. E. Mechanisms of evolved herbicide resistance. **Journal of Biology Chemistry**, v. 295, n. 30, p. 10307-10330, 2020.
- GALVANI, J.; RIZZARDI, M. A.; CARNEIRO, C. M.; BIANCHI, M. A. Anatomia foliar de *Lolium multiflorum* sensível e resistente ao glyphosate. **Planta Daninha**, v. 30, n. 2, p. 407-413, 2012.
- GAZZIERO, D. L. P.; ADEGAS, F. S.; VOLL, E.; VARGAS, L.; KARAM, D.; MATALLO, M. B.; CERDEIRA, A. L.; FORNAROLI, D. A.; OSIPE, R.; SPENGLER, A. N.; ZOIA, L. Interferência da buva em áreas cultivadas com soja. In: XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, 2010, SP. Anais... Ribeirão Preto, 2010
- GOGGIN, D. E.; CAWTHRAY, G. R.; POWLES, S. B. 2,4-D resistance in wild radish: reduced herbicide translocation via inhibition of cellular transport. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 11, p. 3223-35, 2016.
- GROSSMANN, K. Auxin herbicides: Current status of mechanism and mode of action. **Pest Management Science**, v. 66, p. 113-120, 2010.
- HAJRI, H.; MHADHEBI, R.; GHORBEL, A.; ARMSTRONG, J.; SALEM-FNAYOU, A. B. Physiological and leaf ultrastructural characteristics of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) biotypes from Tunisia under sulfonylurea herbicide application. **Scientia Horticulturae**, v. 207, p. 28-32, 2016.
- HEAP, I. M. 2022. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. [www. weedscience.org](http://www.weedscience.org) (Accessed 10.08.2018.).
- HOTCHKISS, R. S.; STRASSER, A.; MCDUNN, J. E.; SWANSON, P. E. Cell death. **New England Journal of Medicine**, v.361, n.16, p.1570-1583, 2009.
- JUGULAM M.; SHYAM C. Non-Target-Site Resistance to Herbicides: Recent Developments. **Plants**.v. 8, n. 10, p. 417, 2019.

LEAL, J. F. L.; SOUZA, A. D. S.; BORELLA, J.; ARAUJO, A. L. S.; LANGARO, A. C.; ALVES, M. M.; FERREIRA, L. J. S.; MORRAN, S.; ZOBIOLE, L. H. S.; LUCIO, F. R.; MACHADO, A. F. L.; GAINES, T. A.; PINHO, C. F. D. Rapid photosynthetic and physiological response of 2,4-D-resistant Sumatran fleabane (*Conyza sumatrensis*) to 2,4-D as a survival strategy. **Weed Science**, v. 70, p. 298-308, 2022.

LEAL, J. F. L.; BORELLA, J.; SOUZA, A. S.; OLIVEIRA, G. F. P. B.; LANGARO, A. C.; PINHO, C. F. Sourgrass and fleabane are controlled by haloxyfop-p-methyl and cloransulam-methyl interaction and interval of application. *Advanced in Weed Scienc*, v. 39, e21237936, 2021.

LESPÉRANCE M. A. Programmed cell death and altered translocation cause glyphosate resistance in giant ragweed (*Ambrosia Trifida* L.). Master of Science, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, (2016).

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, n. 4, p. 809-816, 2012.

MITHILA, J.; HALL, J. C.; JOHNSON, W. G.; KELLEY, K. B.; RIECHERS, D. E. Evolution of Resistance to Auxinic Herbicides: Historical Perspectives, Mechanisms of Resistance, and Implications for Broadleaf Weed Management in Agronomic Crops. **Weed Science**, v. 59, p. 445–457, 2011.

MUKHTAR, M. S.; MCCORMACK, M. E.; ARGUESO, C. T.; PAJEROWSKA-MUKHTAR, K. M. Pathogen tactics to manipulate plant cell death. **Current Biology**, v. 26, n.13, p. 608-619, 2016.

NORSWORTHY, J. K.; BURGOS, N. R.; OLIVER, L. R. Differences in weed tolerance to glyphosate involve different mechanisms. **Weed Technology**, v.15, n. 4, p. 725-731, 2001.

O'DONNELL, P. J.; JONES, J. B.; ANTOINE, F. R.; CIARDI, J.; KLEE, H. J. Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. **The Plant Journal**, v. 25, n. 3, p. 315-323, 2001.

PETERSON, M. A.; MCMASTER S. A.; RIECHERS D. E.; SKELTON J.; STAHLMAN P. W. 2, 4-D past, present, and future: a review. **Weed Technology**, v. 30, n. 2, p. 303-45, 2016.

PINHO, C. F.; LEAL J. F. L.; SOUZA A. S.; OLIVEIRA G. F. P. B.; OLIVEIRA, C.; LANGARO, A. C.; ET AL. First evidence of multiple resistance of Sumatran Fleabane (*'Conyza sumatrensis'*(Retz.) E. Walker) to five-mode-of-action herbicides. **Australian Journal Crop Science**, v. 13, n. 10, p. 1688, 2019.

PITSILI, E.; PHUKAN, U. J.; COLL, N. S. Cell death in plant immunity. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 12, n. 6, p.a036483, 2020.

PLAZA, G. A.; OSUNA, M. D.; DE PRADO, R.; HEREDIA, A. Absorption and translocation of imazethapyr as a mechanism responsible for resistance of *Euphorbia heterophylla* L. biotypes to acetolactate synthase (ALS) inhibitors. **Agromía Colombiana**, v. 24, n. 2, p. 302-305, 2006.

QUEIROZ, A. R.; DELATORRE, C. A.; LUCIO, F. R.; ROSSI, C. V.; ZOBIOLE, L. H.; MEROTTO, A. Rapid necrosis: a novel plant resistance mechanism to 2, 4-D. **Weed Science**, v. 68, n. 1, p. 6-18, 2020.

RAGHAVAN, C.; ONG, E.; DALLING, M.; STEVENSON, T. Regulation of genes associated with auxin, ethylene and ABA pathways by 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in Arabidopsis. **Functional & Integrative Genomics**, v. 6, n. 1, p. 60-70, 2006.

SOARES, D. J.; OLIVEIRA, W. S.; LÓPEZ-OVEJERO, R. F.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Control of glyphosate resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) with dicamba and 2, 4-D. **Planta Daninha**, v. 30, p. 401-406, 2012.

STECKEL, L.E.; GWATHMEY, C.O. Glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) growth, seed production, and interference in cotton. **Weed Science**, v. 57, n. 3, p. 346-350, 2009.

TUFFI SANTOS, L.D.; FERREIRA, F.A.; MEIRA, R.M.S.A.; BARROS, N.F.; FERREIRA, L.R., MACHADO, A.F.L. Crescimento e morfoanatomia foliar de eucalipto sob efeito de deriva do glyphosate. **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 133-142, 2005.

VAN HORN, C. R.; MORETTI, M. L.; ROBERTSON, R. R.; SEGOBYE, K.; WELLER, S. C.; YOUNG, B. G.; JOHNSON, W. G.; SCHULZ, B.; GREEN, A. C.; JEFFERY, T.; LESPÉRANCE, M. A. Glyphosate resistance in *Ambrosia trifida*: Part 1. Novel rapid cell death response to glyphosate. **Pest Management Science**, v. 74, p. 1071-1078, 2018.

WALSH, T. A.; NEAL R.; MERLO, A. O.; HONMA, M.; HICKS, G. R.; WOLFF, K.; MATSUMURA, W.; DAVIES, J.P. Mutations in an Auxin Receptor Homolog AFB5 and in SGT1b Confer Resistance to Synthetic Picolinate Auxins and Not to 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid or Indole-3-Acetic Acid in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.142, p. 542–552, 2006.

4 CAPÍTULO II

**LOSS OF 2,4-D TRANSLOCATION AND METABOLISM IN 2,4-D RESISTANT
Conyza sumatrensis DUE TO RAPID PHYSIOLOGICAL RESPONSE**

**PERDA DE TRANSLOCAÇÃO E METABOLIZAÇÃO DE 2,4-D EM *Conyza
sumatrensis* RESISTENTE DEVIDO A RÁPIDA RESPOSTA FISIOLÓGICA**

Running title: Non target resistance to 2,4-D herbicide

RESUMO

A resistência ao ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) foi relatada em várias espécies de plantas daninhas desde a década de 1950; no entanto, um biótipo de *Conyza sumatrensis* mostrando uma nova resposta rápida minutos após a aplicação do herbicida foi relatado em 2017. Esta pesquisa investiga o mecanismo de resistência em *C. sumatrensis* com rápida resposta fisiológica ao 2,4-D. Foram realizados três experimentos com biótipos resistentes e suscetíveis de *Conyza sumatrensis*. O primeiro ensaio foi avaliada a absorção e translocação do herbicida ^{14}C -2,4-D. A folha mais expandida, foi tratada com 3.84 kBq. As coletas foram realizadas as 3, 12, 24, 48, 72 e 96 HAT e divididas em três partes: folha tratada, outras folhas e raiz. As partes das plantas previamente divididas foram secas em estufa a 50°C por 48 h e queimadas em um oxidante biológico. O segundo ensaio foi avaliado a metabolização do herbicida ^{14}C -2,4-D. A aplicação e as coletas foram realizadas como no primeiro ensaio. Foi realizada a extração e avaliadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência. O terceiro ensaio foi avaliado o efeito do malathion como inibidor da citocromo P450. O inseticida malathion (1,000 g i.a ha⁻¹) foi aplicado 2h antes do herbicida 2,4D [1/16, 1/8, 1/4, 1/2, 1 (dose recomendada (1) foi definida como 1005 g i.a ha⁻¹)] e avaliados controle visual aos 14, 21 e 35 dias e massa seca 35 DAA. Foram encontradas diferenças na absorção de 2,4-D entre os biótipos resistentes e suscetíveis. A translocação do herbicida foi reduzida no biótipo resistente em relação ao suscetível. Em plantas resistentes 98,8% de [^{14}C]2,4-D foi encontrado na folha tratada, enquanto aproximadamente 13% translocou para outras partes da planta no biótipo suscetível. Plantas resistentes não metabolizaram [^{14}C] 2,4-D e tiveram apenas [^{14}C] 2,4-D intacto 96 h após a aplicação, enquanto plantas suscetíveis metabolizaram [^{14}C] 2,4-D em quatro metabólitos detectados. O pré-tratamento com malathion, um inibidor do citocromo P450, não alterou o controle visual ou a massa seca após a aplicação de 2,4-D. Nossos resultados demonstram que a translocação reduzida de 2,4-D contribui para a resistência no biótipo *C. sumatrensis*. A redução no transporte de 2,4-D e a perda do metabolismo de 2,4-D podem ser consequências da hipersensibilidade de *C. sumatrensis* resistente. A rápida resposta fisiológica que resulta na morte do tecido foliar após a exposição ao 2,4-D pode impedir a ativação do 2,4-D e a translocação para o local de ação.

Palavras-chave: rápida resposta fisiológica, resistência de sítio não-alvo, *Conyza sumatrensis*, 2,4-diclorofenoxiacético ácido, necrose, herbicida radiomarcado

ABSTRACT

Resistance to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) has been reported in several weed species since the 1950s; however, a biotype of *Conyza sumatrensis* showing a novel rapid response minutes after herbicide application was reported in 2017. This research investigates the mechanism of resistance in *C. sumatrensis* with rapid physiological response to 2,4-D. Three experiments were carried out with resistant and susceptible biotypes of *C. sumatrensis*. The first experiment was evaluated the absorption and translocation of the herbicide [¹⁴C] 2,4-D. The most expanded leaf was treated with 3.84 kBq. The collections were performed as 3, 12, 24, 48, 72 and 96 HAT and divided into three parts: treated leaf, other leaves, and root. The parts of the previously divided plants were dried in an oven at 50°C for 48 h and burned in a biological oxidizer. The second assay was to evaluate the metabolism of the herbicide [¹⁴C] 2,4-D. The application and collections were carried out as in the first experiment. The extraction was performed in a high-performance liquid chromatograph. The third experiment were evaluated the effect of malathion as a cytochrome P450 inhibitor. The insecticide malathion (1,000 g i.a ha⁻¹) was applied 2h before the 2,4-D herbicide [1/16, 1/8, 1/4, 1/2, 1 (recommended dose (1) was defined as 1005 g i.a. ha⁻¹)] and evaluation of visual control at 14, 21 and 35 days and dry mass 35 DAA. Differences were found in 2,4-D absorption between the resistant and susceptible biotypes. Herbicide translocation was reduced in the resistant biotype compared to the susceptible. In resistant plants 98.8% of [¹⁴C] 2,4-D was found in the treated leaf, while approximately 13% translocated to other plant parts in the susceptible biotype at 96 h after treatment. Resistant plants did not metabolize [¹⁴C] 2,4-D and had only intact [¹⁴C] 2,4-D at 96 h after application, while susceptible plants metabolized [¹⁴C] 2,4-D to four detected metabolites. Pre-treatment with the cytochrome P450 inhibitor malathion did not enhance 2,4-D sensitivity in either biotype. Our results demonstrate that reduced 2,4-D translocation contributes to resistance in the *C. sumatrensis* biotype. The reduction in 2,4-D transport and the loss of 2,4-D metabolism are likely consequences of a rapid hypersensitive response in resistant *C. sumatrensis*.

Key words: rapid physiology response, non-target site resistance, *Conyza sumatrensis*, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, necrosis, radiolabeled herbicide

4.1 INTRODUCTION

Conyza sumatrensis is a worldwide troublesome weed that can cause significant yield loss in several agronomic crops. Originally from South America, *C. sumatrensis* is a prolific seed producer and its ability to reproduce and adapt in to no-tillage systems have contributed to its spread in different agricultural areas (WEAVER, 2001). Glyphosate and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) are often used in combination for burndown herbicide application prior to planting soybean in Brazil (TAKANO et al., 2013).

The synthetic auxin herbicide 2,4-D was introduced for weed control in 1945 and since, has been playing an important role in weed control. The first weed to evolve resistance to 2,4-D was reported in 1957 and there have been 47 subsequent unique reports of resistance to synthetic auxins in the world (HEAP, 2022). In 2017 a population of *C. sumatrensis* resistant to herbicides from five different modes of action (MOA), including 2,4-D, was reported in Brazil (GROSSMANN et al., 2011). In this population, resistance to 2,4-D is complex and non-typical. Typical 2,4-D injury symptoms include curling, epinasty, stem thickening and plant death (PAZMIÑO et al., 2012, LEAL et al., 2022); however, in this resistant population from Brazil, plants exhibited necrotic leaves approximately 30 minutes to four hours after herbicide application, followed by loss of leaves. Fifteen days after the initial symptoms the plants started to regrow resulting in failed control (GAINES et al., 2020). Based on herbicide symptomology and previous reports in different weed species this is a putative a case of rapid physiological response, a kind of non-target-site resistance that is a very unusual herbicide resistance mechanism in plants.

Mechanisms of herbicide resistance in weeds can be classified as target-site resistance (TSR) and non-target-site resistance (NTSR). The former involves one or more mutations in genes whose protein products contain the herbicide-binding, resulting in an insensitive or less sensitive herbicide target protein (Powles & Yu, 2010; Délye 2013). The latter involves one or a combination of mechanisms that limit the amount of active herbicide reaching the site of action (Délye, 2013; Lespérance, 2016), including reduced herbicide absorption and/or translocation, vacuolar sequestration, metabolic alteration (Powles & Yu, 2010) and rapid necrosis of mature leaves, resulting in reduced herbicide translocation (VAN HORN et al., 2018).

To date, *Ambrosia trifida* is the only weed species with rapid physiological response as a mechanism of resistance to glyphosate (MORETTI et al., 2018). The authors attributed the reduced glyphosate translocation to rapid cell death response in the resistant biotype (MORETTI et al., 2018). This mechanism of resistance acts by preventing herbicide translocation in the plant, which is essential for the efficacy of systemic herbicides such as glyphosate and 2,4-D.

In several weed species, NTSR is the most common mechanism of resistance to synthetic auxins (RIAR et al., 2011). Reduced translocation of auxin herbicides was reported in resistant populations of *Raphanus raphanistrum* L. (RIAR et al., 2011), *Lactuca serriola* L. (REY-CABALLERO et al., 2015), *Papaver rhoeas*, *Sisymbrium orientale* (DANG et al., 2018), and *Bassia scoparia* (PETTINGA et al., 2018); however, in these cases, the rapid necrosis of the leaves was not observed. Target-site mutations in Aux/IAA auxin co-receptor genes were identified as the causative resistance mechanism in *S. orientale* (FIGUEIREDO et al., 2022) and *B. scoparia* (LECLERE et al., 2018) populations with reduced translocation.

In order to better understand the resistance mechanism to 2,4-D in the Brazilian biotype of *C. sumatrensis* resistant to five MOAs, we examined three possible NTSR mechanisms. The

three primary objectives of this research were to analyze 2,4-D absorption, translocation, and metabolism to identify the mechanism of resistance to 2,4-D in this population. We supplement this effort with identification of differentially expressed transcripts associated with the rapid response to 2,4-D to understand what genes/pathways underly this response.

4.2 MATERIALS E METHODS

4.2.1 Plant Material

Seeds of *C. sumatrensis* were obtained from Assis Chateaubriand-Paraná, Brazil (24°16'53.8"S 53°30'47.5"W). The field area has a history of numerous applications of 2,4-D, glyphosate, paraquat+diuron, and saflufenacil. After screening, the plants were self-pollinated, and a dose-response experiment was conducted on the progeny to confirm resistance to paraquat and saflufenacil (DANG et al., 2018) These survivors were self-pollinated (S1) and a dose-response conducted on the second self-pollinated (S2) resistance to 2,4-D, glyphosate and diuron (PETTINGA et al., 2018)

4.2.2 Plant growth conditions

Susceptible and resistant biotypes of *C. sumatrensis* were grown in optimum greenhouse conditions (25 °C and relative humidity of 75%). Plants were watered daily. Plastic containers (Dillen D804 Standard Insert Black 100c/s) filled with commercial substrate (Lambert LM-GPS) were used. Approximately 30 days after germination, when the plants had two true leaves, both biotypes were transplanted into pots with a capacity of 0.1 L and filled with the same commercial substrate. For absorption and translocation experiments, plants with four to five true leaves were transplanted to plastic tubes filled with silica sand and moved to a growth chamber. For the malathion experiment, plants were maintained in commercial substrate and treated at the five to six true leaves stage.

4.2.3 [¹⁴C]2,4-D absorption and translocation

The experiment was carried out following the methods of Figueiredo et al., 2018. Plants with four to five true leaves were transferred to 50 mL falcon tubes filled with fine unwashed silica sand. Plants were watered daily, and fertilizer was added one day after transplanting (0.05% Miracle-Gro solution; Scotts Miracle-Gro Company, Marysville, OH, USA).

The plants were moved to a growth chamber with 12 h photoperiod, 25 °C, 70% relative humidity and 500 mmol m⁻² s⁻¹ light. The second fully expanded leaf of each plant was treated with [¹⁴C] 2,4-D mixed with formulated 2,4-D (2,4-D amine; 455 g L⁻¹; DuPont, Wilmington, DE, USA) and 0.25% non-ionic surfactant (NIS) (Alkylpolyoxethylene; Alligare, Opelika, AL, USA). Each plant was treated with six × 1 μL droplets (10 mg 2,4-D cm⁻²). Total radioactivity applied per plant was 200,000 dpm (3.84 KBq). Four plants of each biotype were randomly harvested at 3, 12, 24, 48, and 96 h after treatment (HAT). The treated leaf of each plant was cut and washed with 5 mL of washing solution (89:10:1 water:methanol:NIS). The leaf wash was mixed with 10 mL of scintillation solution (Ecoscint™ XR, National Diagnostics, Atlanta, GA, USA). The roots were washed with 10 mL of water and 1 mL of water rinsate was collected and added to 10 mL of scintillation solution. The leaves and roots rinsates were measured for radioactivity using liquid scintillation spectrometry (LSS) (Packard Tri-carb 2300TR, Packard Instrument Co., Meriden, CT, USA).

Plants were pressed in newspaper, dried at 60 °C for 72 h, exposed to Phosphor Screen film (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA) for 72 h, and film was imaged with a Typhoon Trio Imager (GE Healthcare). The dried plants were separated in treated leaf, roots and rest of the plants and oxidized in a biological oxidizer (OX500; RJ Harvey Instrument Co., Tappan, NY, USA). The proportion of [¹⁴C]2,4-D absorbed were calculated using the equation:

$$\%H_{abs} = [^{14}\text{C}_{ot} / (^{14}\text{C}_{ot} + ^{14}\text{C}_{wl})] \times 100$$

where %H_{abs} is the proportion of absorbed herbicide, ¹⁴C_{ot} is the amount of ¹⁴C measured in oxidized tissue, and ¹⁴C_{wl} is the amount of ¹⁴C detected in the treated leaf. For translocation [¹⁴C]2,4-D was calculated using:

$$\%H_{tr} = 100 - [^{14}\text{C}_{al} / (^{14}\text{C}_{tl} + ^{14}\text{C}_{ol})] \times 100$$

where %H_{tr} is the proportion of translocated herbicide, ¹⁴C_{tl} is the amount of ¹⁴C measured in the treated leaf, and ¹⁴C_{ol} is the amount of ¹⁴C detected in other leaves/roots

4.2.4 Metabolism Experiment [¹⁴C]-2,4-D

Plants were treated with radioactive herbicide under the same conditions as the [¹⁴C]2,4-D absorption and translocation experiment. The plants were collected at 3, 12, 24, 48 and 96 HAT and at each time point, treated leaves, roots, and sand were washed, and the plant tissue was rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -20 °C. Metabolite extraction was conducted using all plant material. The whole plants were ground in 50 mL plastic tubes and digested in a 5 mL solution of 1% acetic acid on a table shaker for 10 min. Extracts were transferred into 50 mL centrifuge filters with 25 mL microfiltration membranes (pore size of 0.45 μm). The extraction step was repeated two more times for a total volume extracted of 15 mL per plant. The centrifuge filter and the tissue were dried and kept for oxidation to quantify non-extracted metabolites. The final extracted volume was passed through a solid-phase extraction C18 cartridge, and a 5 mL aliquot of extracts that passed through the cartridge was quantified by LSS. About 95% of radioactivity interacted with the silica matrix and was recovered with 4 mL of acetonitrile then dried in an evaporation system under vacuum at 35°C.

The extracts were suspended in 225 μL of high-performance liquid chromatography (HPLC) solvent A and filtered in 1.5 mL centrifuge tubes with 0.4 μm microfiltration membranes at 12,000 × g. Filtered solution (200 μL) was used for HPLC (Hitachi Instruments, Inc., San Jose, CA) analysis using a 4.6 mm by 150 mm column (C18 Column, Zorbax Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), attached to a radio-detector (FlowStar LB 513, Berthold Technologies GmbH & Co.) with a flow cell YG-150-U5D solid cell YG-Scintillator (150 μl). Mobile phase A contained 89.9% water, 10% acetonitrile, and 0.1% formic acid and phase B contained 99.9% acetonitrile and 0.1% formic acid. The proportion of 2,4-D metabolism was calculated using the equation:

$$\%2,4\text{-D-Parent} = [(HPLC \text{ detected } 2,4\text{-D}) / (HPLC \text{ detected } 2,4\text{-D} + HPLC \text{ detected metabolites} + \text{counts in oxidized filters} + \text{counts in digestion solution after C18 cartridge separation} + \text{counts in washed sand})] \times 100$$

where %2,4-D-Parent is the proportion of non-metabolized herbicide. The experiment had three replications and it was repeated in time.

4.2.5 Malathion effect on 2,4-D resistance

Treatments were arranged in a factorial design with five 2,4-D rates [1/16, 1/8, 1/4, 1/2, 1 rate (the recommend rate (1) was defined to be 1,005 g a.i. ha⁻¹); one malathion rate (1,000 g a.i. ha⁻¹) and four replications. Malathion treatments were applied 2 h before 2,4-D application.

Malathion and herbicide treatments were sprayed using a CO₂-pressurized backpack sprayer equipped with four TeeJet XR110015 flat-fan nozzles (TeeJet Technologies, Springfield, IL, USA), which delivered 150 L ha⁻¹ of spray solution at 280 kPa and a ground speed of 4.53 km h⁻¹ under environmental conditions of 20 °C, 81.2% relative humidity, and 2 km h⁻¹ wind speed.

Visual control of *C. sumatrensis* was evaluated at 14, 21 and 35 days after applications (DAA). The visual symptoms follow a scale from 0 - 100%, where 0% represents the absence of symptoms, and 100% represents plant death (FRANS & CROWLEY, 1986) Plants were harvested 35 DAA, dried in an oven at 65° C and weighed.

4.2.6 Statistical Analyses

Absorption, translocation, metabolism, and dose response with malathion, were analyzed using analysis of variance (ANOVA) at $P \leq 0.05$, performed using the software R. A nonlinear curve model was plotted using SigmaPlot 12.5. Absorption and translocation experiments and 2,4-D metabolism were analyzed following a rectangular hyperbolic model (KNISS et al., 2011). Malathion dose responses were analyzed using a three-parameter Sigmoidal logistic model.

4.3 RESULTS AND DISCUSSION

4.3.1 [¹⁴C]2,4-D absorption and translocation

The absorption of ¹⁴C-2,4-D was different between the two *C. sumatrensis* biotypes. The percentage of absorbed herbicide at three HAA was approximately $15.7 \pm 5\%$ and $7.45 \pm 2\%$ for the resistant and susceptible biotypes, respectively. By 12 and 24 HAA the absorption was higher in the resistant biotype (Figure 1A). At 96 HAA, absorption was 21% higher in the susceptible ($69.58 \pm 1\%$) than in the resistant biotype ($48.26 \pm 7\%$) (Figure 1A). Despite the differences in herbicide absorption rates in the two biotypes, herbicide absorption alone does not appear to play a role in herbicide resistance. The lower absorption could be explained by differences in the biotype's characteristics, such as differences in leaf cuticle or by the cell death that rapidly occurs (FADIN et al., 2019).

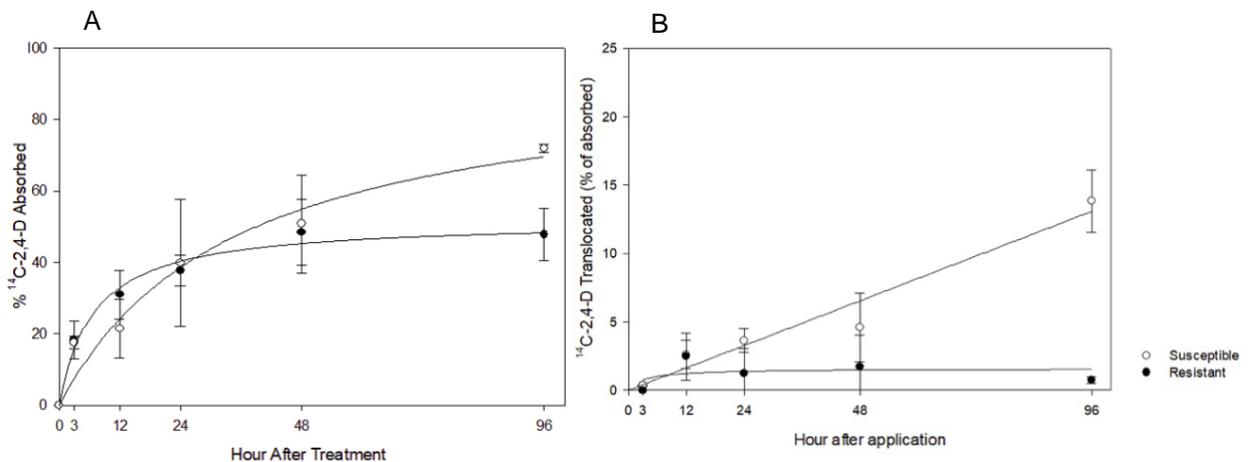


Figure 1. Absorption (A) and translocation (B) of [¹⁴C] 2,4-D in susceptible and resistant biotypes of *C. sumatrensis*. Absorption and translocation were measured at 3, 12, 24, 48, and 96 hours after treatment. The lines were fitted to the values using rectangular hyperbolic model. (Means and standard error bars of n=4). The nonlinear regression equation for %¹⁴C-2,4-D absorbed for resistant and susceptible are $Y = 51.7182 * x / (6,8659 + x)$, $R^2=0,97$; $Y = 95,2041 * x / (35,3437 + x)$, $R^2=0,96$, respectively. The nonlinear regression equation for %¹⁴C-2,4-D translocated (% absorbed) for resistant and susceptible biotypes are $Y = 1.0144 * x / (-7.0439 + x)$, $R^2=0,85$; $Y = 1.20^{12} * x / (8.7^{12} + x)$, $R^2=0,97$, respectively. PDPA/UFRRJ, 2022.

The absorption of ¹⁴C-2,4-D was different between the two *C. sumatrensis* biotypes. The percentage of absorbed herbicide at three HAA was approximately $15.7 \pm 5\%$ and $7.45 \pm 2\%$ for the resistant and susceptible biotypes, respectively. By 12 and 24 HAA the absorption was higher in the resistant biotype (Figure 1A). At 96 HAA, absorption was 21% higher in the susceptible ($69.58 \pm 1\%$) than in the resistant biotype ($48.26 \pm 7\%$) (Figure 1A). Despite the differences in herbicide absorption rates in the two biotypes, herbicide absorption alone does not appear to play a role in herbicide resistance. The lower absorption could be explained by differences in the biotype's characteristics, such as differences in leaf cuticle or by the cell death that rapidly occurs (FADIN et al., 2019).

Most applied herbicide was retained in the treated leaf of resistant plants. At 96 HAA the treated leaf retained $98.9\% \pm 0.4$ of the absorbed ¹⁴C-2,4-D (Figure 2A) (Figure 3A), while very little was detected in the other leaves ($0.71\% \pm 0.08$) (Figure 2B) (Figure 3B) and roots ($0.83\% \pm 0.4$) (Figure 2C). The susceptible biotype at the same time had less herbicide in the

treated leaf ($84.4\% \pm 1$) (Figure 2 A) and more in the other leaves (Figure 2 B) ($12.88\% \pm 1.3$) and roots ($7.04\% \pm 0.58$) (Figure 2 C). Because 2,4-D is a systemic herbicide, one possible mechanism of resistance can be related to changes in herbicide movement in the plant. Due to the rapid physiological response observed in resistant plants, reduced herbicide translocation was expected in this biotype. Herbicide translocation to other plant parts was approximately 1.5% in the resistant biotype at 96 HAA, with most of the herbicide staying in the treated leaf, while in the susceptible biotype, herbicide translocation increased over time, reaching approximately $15 \pm 2\%$ of the total absorbed herbicide moving to other plant parts

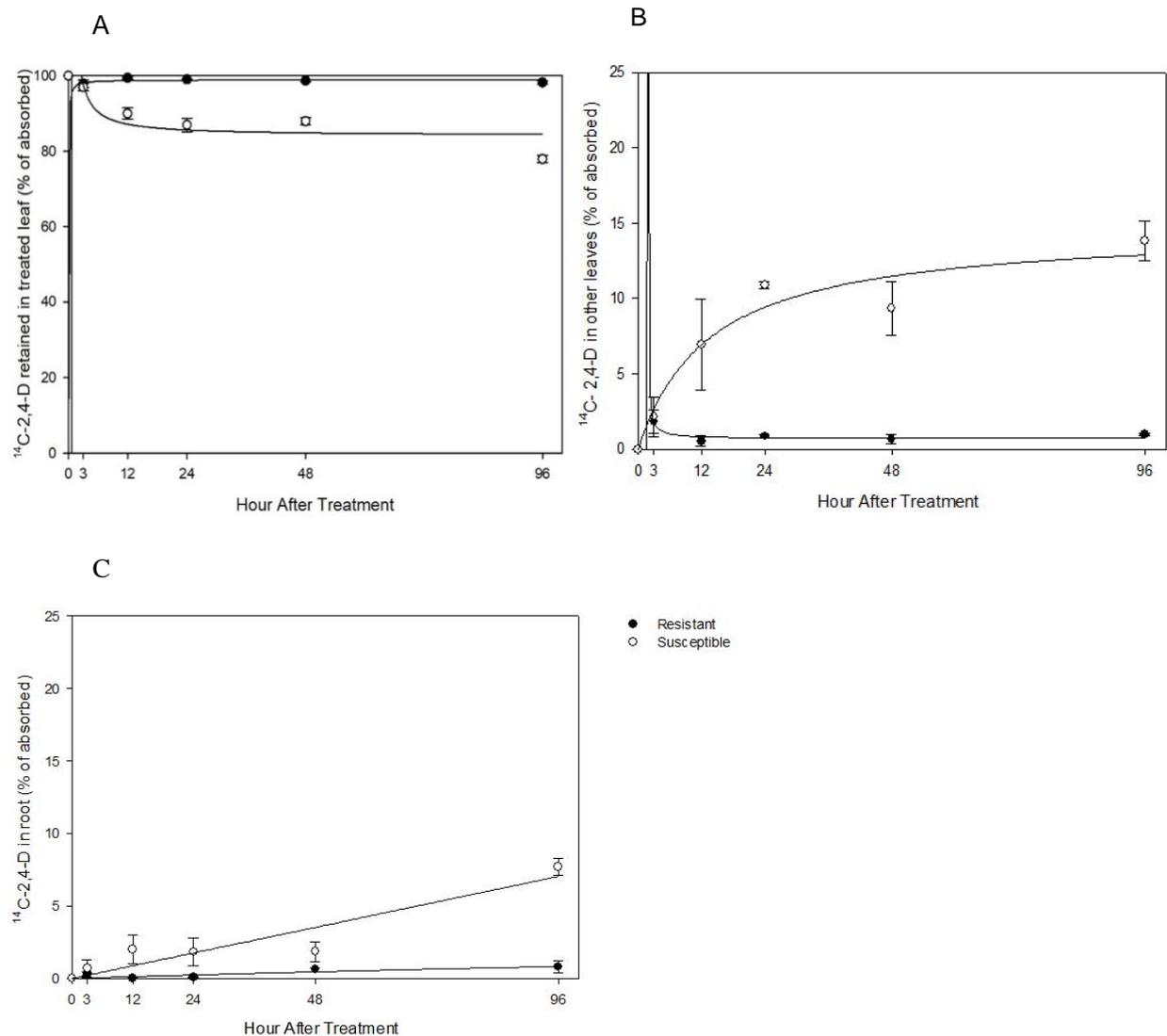


Figure 2. Distribution of $[^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ in the treated leaf (A), other leaves (B) and roots (C) of resistant and susceptible *C. sumatrensis*. The lines were fitted to the values using rectangular hyperbolic model (Means and standard error bars of $n=4$). The nonlinear regression equation for % ^{14}C -2,4-D retained in treated leaf (% absorbed) in resistant and susceptible are $Y = 98.9075 * x / (0.0245 + x)$, $R^2=0,53$; $Y = 84.1866 * x / (-0.4144 + x)$, $R^2=0,81$, respectively. The nonlinear regression equation for % ^{14}C -2,4-D in the other leaves (% absorbed) in resistant and susceptible are $Y = 0.6988 * x / (-1.8337 + x)$, $R^2=0,95$; $Y = 14.6984 * x / (13.4997 + x)$, $R^2=0,97$, respectively. The nonlinear regression equation for % ^{14}C -2,4-D retained in root (% absorbed) in resistant and susceptible are $Y = 3.8879 * x / (353.5272 + x)$, $R^2=0,89$; $Y = 3,7^{11} * x / (5.1^{12} + x)$, $R^2=0,93$, respectively. PDPA/UFRRJ, 2022.

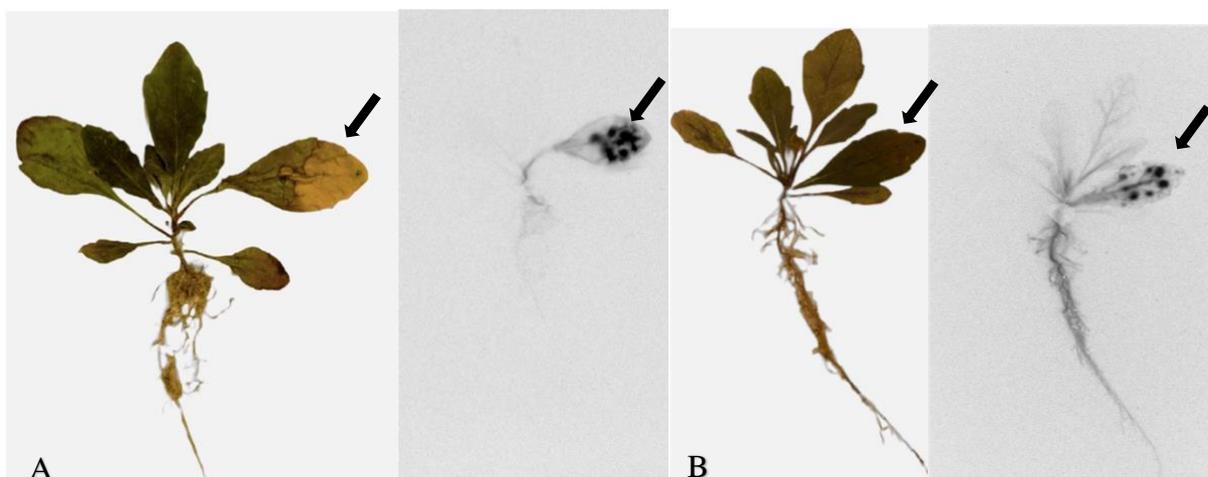


Figure 3. Phosphor images of [^{14}C] 2,4-D in resistant (A) and susceptible (B) biotype of *Conyza sumatrensis* at 96 hours after treatment. Each plant is shown in camera image (left) and phosphor image (right). The arrows points indicate the treated leaf where radioactive herbicide was applied.

4.3.2 Metabolism Experiment ^{14}C -2,4-D

To determine if 2,4-D metabolism was a factor in the resistance mechanism of this *C. sumatrensis* population, we measured [^{14}C]2,4-D metabolism over time. The analytical [^{14}C]2,4-D standard eluted as a single peak with a retention time (RT) of 14.2 min. Since no other peaks were observed, any other radioactive peaks with different RT are considered products derived from 2,4-D metabolism (Figures 3A and B). In the susceptible biotype we detected the presence of intact 2,4-D and four other metabolites at 96 HAT, metabolite 1 (RT = 13.33 min), metabolite 2 (RT = 12.9 min), metabolite 3 (RT = 12.1 min) and metabolite 4 (RT = 11.6 min). Susceptible plants have a smaller 2,4-D peak than resistant plants, indicating faster metabolism of the herbicide. Sensitive plants in some cases can metabolize 2,4-D through reversible conjugation reactions and the metabolites produced are promptly converted back to the original acid (PETERSON et al., 2016).

The resistant biotype did not show any radioactive peaks other than 2,4-D (Figure 3B). The first rapid response symptoms in resistant plants start 30 min after application (GAINES et al., 2020) preventing translocation and reducing the chances of the herbicide being metabolized by the plant (Figure 3C). Metabolism of 2,4-D by the plant is based on three main mechanisms: the degradation or chemical modification of the acetic acid; the hydroxylation of the aromatic ring; and the conjugation of the 2,4-D molecule to amino acids, mainly glutamate and aspartate, and glucose (HATZI-HATZIOS, 2005). Since the rapid physiological response reduced the herbicide translocation in resistant plants, it appears that the rapid response also inhibits the 2,4-D metabolism pathways that normally occur in *C. sumatrensis*. From these results, enhanced herbicide metabolism is not part of the 2,4-D resistance mechanism.

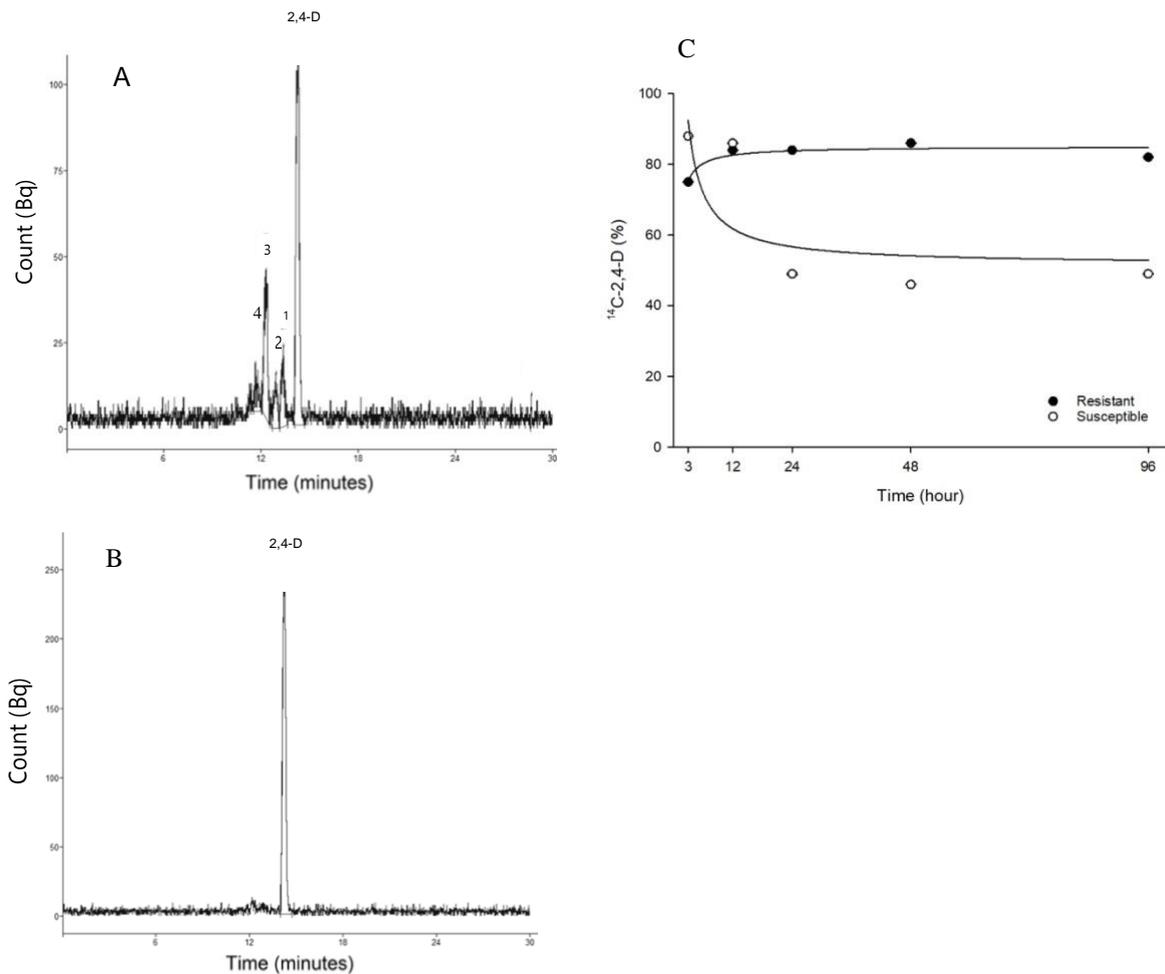


Figure 4. [^{14}C]-labeled 2,4-D metabolism in resistant and susceptible biotypes of *Conyza sumatrensis*. Susceptible (A) and resistant (B) HPLC chromatograms of [^{14}C] 2,4-D metabolism at 96 HAT (radioactive units in Bq vs retention time in min), with different metabolites numbered in order of their respective retention times. Non-linear regression of 2,4-D (C) metabolism at different time points after herbicide application. The nonlinear regression equation for ^{14}C -2,4-D (%) in resistant and susceptible are $Y = 85.1215 * x / (0.3825 + x)$, $R^2=0,91$; $Y = 54.4018 * x / (-1,1897 + x)$, $R^2=0,73$, respectively. PDPA/UFRRJ, 2022.

4.3.3 2,4-D dose response metabolism experiment with P450 inhibitors

Treatment with malathion prior to 2,4-D treatment did not change visual evaluation or dry biomass weight relative to no malathion treatment for either resistant or susceptible biotypes (Figure 4 A, B, C and D). Malathion is an insecticide that has been used as an effective inhibitor of cytochrome P450 mediated metabolism of herbicides to evaluate NTSR in plants (WERCK-REICHHART, 2000). The metabolism of herbicides by cytochrome P450 involves reduction or modification into less phytotoxic products that will be inactivated, often by conjugation with glucose and transported to the vacuole (POWLES & YU, 2010). In some cases, malathion application suppressed cytochrome P450, reverting resistant biotypes into susceptible. Herbicide resistance mediated by cytochrome P450 monooxygenases have been reported in other weed species like *Papavar rhoeas* (TORRA et al., 2017) and *Amaranthus tuberculatus* (OLIVEIRA et al., 2018). In this study pre-treatment with malathion as a cytochrome P450 inhibitor did not affect the sensitivity of *C. sumatrensis* to 2,4-D.

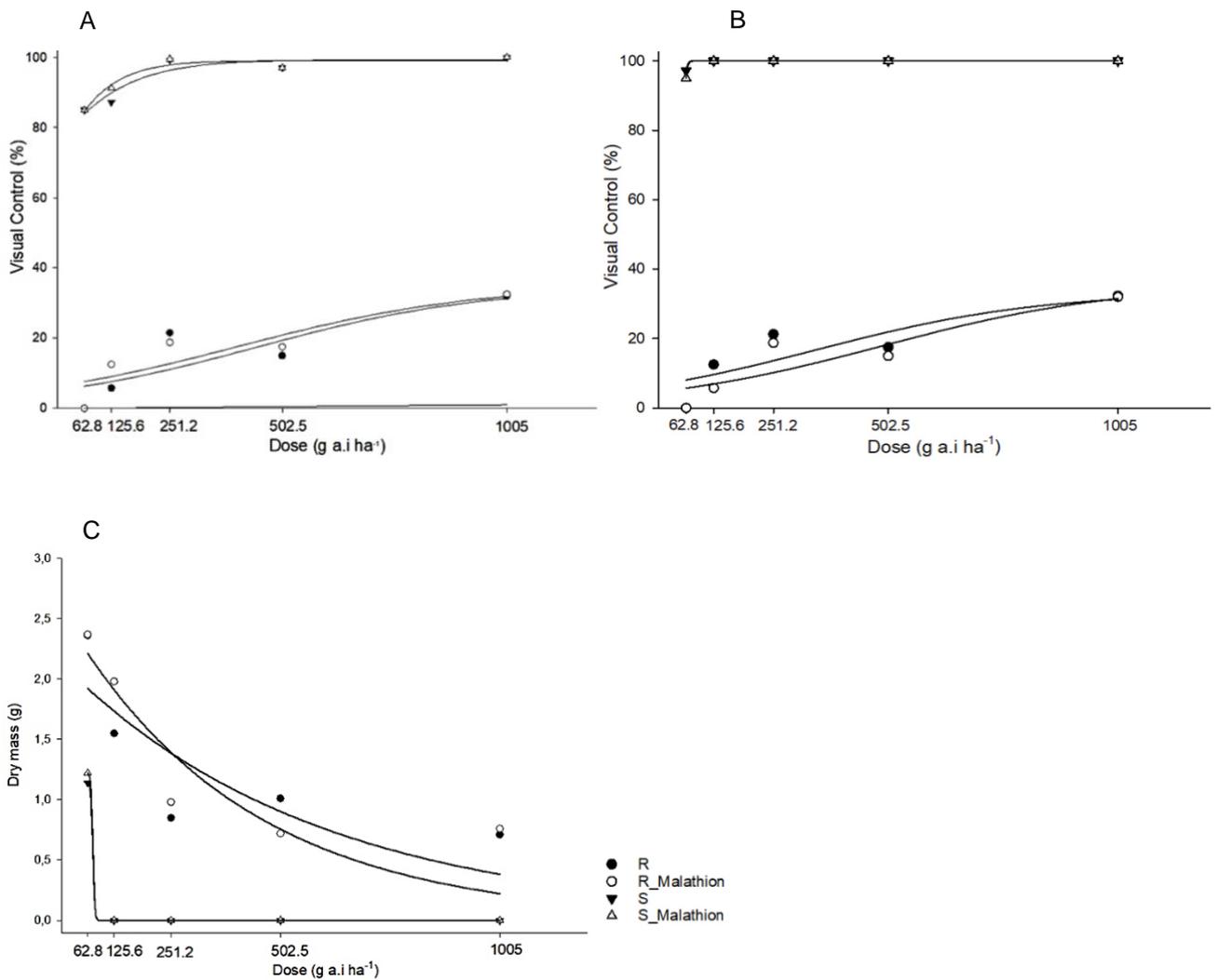


Figure 5. Dose–response regression curves of 2,4-D with and without application of 1,000 g ai ha⁻¹ of malathion in resistant and susceptible *C. sumatrensis*. Visual control evaluations were measured at 14(A) and 21(B) days after application and the dry mass 35 days after application (C). The lines were fitted to the values using three-parameter Sigmoidal-logistic model.

4.4 CONCLUSIONS

These results show reduced translocation of ^{14}C -2,4-D in resistant *C. sumatrensis*, in which the herbicide accumulated in the treated leaf, while the susceptible biotype had translocation from the treated leaf to other leaves and roots. Resistant and susceptible biotypes had differences in absorption, with resistance biotypes initially absorbing 2,4-D more rapidly but susceptible biotypes absorbing more after 96 h, though these differences in absorption rates between resistant and susceptible plants do not account for resistance. Enhanced 2,4-D metabolism does not contribute to 2,4-D resistance in *C. sumatrensis*. The resistant biotype did not form any 2,4-D metabolites by 96 HAA. Pre-treatment with the cytochrome P450 inhibitor malathion did not affect 2,4-D sensitivity in either biotype.

The necrosis observed in the leaves of resistant plants after 2,4-D exposure could be preventing herbicide translocation to the apical and axillary meristems, resulting in herbicide retention in the treated leaves. 2,4-D is translocated via the phloem through concentration gradient to meristematic regions (DEVINE & HALL, 1990). This transport can be through the apoplast or symplast controlled by the activity of the auxin transporters in the plasma membrane (YANG et al., 2006). In this case, an alteration in auxin transport reduced the 2,4-D herbicide concentration at the meristematic target site to a low level, enabling survival of the resistant biotype.

Similar herbicide translocation patterns were observed in glyphosate-resistant *Ambrosia trifida*, where the authors reported reduced translocation caused by a similar rapid physiological response (VAN HORN et al., 2018; MORETTI et al., 2018). For that population, leaf curling symptoms started at 6 HAA and total tissue desiccation and apparent plant death by 24 HAA. Four weeks after treatment, the resistant plants regrew from axillary and apical meristems. This structural phenomenon has been described as apoptosis-like programmed cell death (AL-PCD) (VAN HORN et al., 2018).

Programmed cell death (PCD) is a cellular process in plants that can occur through biotic or abiotic stresses, such as herbicide application (PALAVAN-UNSAL et al., 2005; REAPE & MCCABE, 2008). The process is active and genetically controlled and involves several different morphological and biochemical mechanisms that play an essential role in plant growth and development (MORETTI et al., 2018; PETROV et al., 2015). In the case of abiotic stress PCD ensures survival of the entire plant, at the cost of sacrificing some localized region(s) (PALAVAN-UNSAL et al., 2005). In our population, we hypothesize that the rapid physiological response in the resistant biotype could be considered an AL-PDC. The plant symptoms are the ones of cell apoptosis, when there is a suicide of the cells to avoid spreading the stress caused by the abiotic factor. Therefore, we conclude that the reduced herbicide translocation is a consequence of the controlled cell death process.

Reduced 2,4-D translocation appears to be a physiological consequence of the rapid physiological response to 2,4-D in resistant *C. sumatrensis*. The complex and adaptive mechanism limited 2,4-D translocation and enabled regrowth of the primary meristem. The rapid cell death in the resistant biotype could be a form of apoptosis-like PCD, however; additional anatomical analysis is necessary to distinguish the specific morphological characteristics and the events occurring during 2,4-D induced cell death to elucidate the specific form of cell death that is occurring.

4.5 REFERENCES

- ALTSCHUL S. F.; GISH W.; MILLER W.; MYERS E.W.; LIPMAN D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.
- DANG, H. T.; MALONE, J. M.; BOUTSALIS, P.; KRISHNAN, M.; GILL, G.; PRESTON, C. Reduced translocation in 2,4-D-resistant oriental mustard populations (*Sisymbrium orientale* L.) from Australia. **Pest Management Science**, v. 74, p.1524-1532, 2018.
- DÉLYE C, Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. **Pest Management Science**, v. 69, n. 2, p. 176-187, 2013.
- DEVINE, M. D.; LINDA M. H. Implications of sucrose transport mechanisms for the translocation of herbicides. **Weed Science**, v. 38, p. 299-304, 1990.
- FADIN D. A.; MONQUERO P. A. Leaf characterization of Spermacoce verticillate at three stages of development. **Australian Journal of Crop Science**, v. 13, p. 792-797, 2019.
- FIGUEIREDO, M. R. A. D.; KÜPPER, A.; MALONE, J. M.; PETROVIC, T.; FIGUEIREDO, A. B. T. B. D.; CAMPAGNOLA, G.; PEERSEN, O. B.; PRASAD, K. V. S. K.; PATTERSON, E. L.; REDDY, A. S. N.; KUBEŠ, M. F.; NAPIER, R.; DAYAN, F. E.; PRESTON, C.; GAINES, T. A. An in-frame deletion mutation in the degron tail of auxin coreceptor *IAA2* confers resistance to the herbicide 2,4-D in *Sisymbrium orientale*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 119, p. e2105819119, 2022.
- FIGUEIREDO, M. R. A.; LEIBHART, L. J.; REICHER, Z. J.; TRANEL, P. J.; NISSEN S. J.; WESTRA, P.; BERNARDS, M. L.; KRUGER, G. R.; GAINES, T. A.; JUGULAM, M. Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid contributes to resistance in a common waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) population. **Pest Management Science**, v. 74, p. 2356–2362, 2018.
- FRANS, R., TALBERT, R., MARX, D. AND CROWLEY, H. Experimental Design and Techniques for Measuring and Analyzing Plant Responses to Weed Control Practices. In: Camper, N.D., Ed., Southern Weed Science Society, Research Methods in Weed Science, 3rd Edition, WSSA, Champaign, 29-46, 1986.
- GAINES, T. A.; DUKE, S. O.; MORRAN, S.; RIGON, C. A. G.; TRANEL, P. J.; KÜPPER, A.; DAYAN, F. E. Mechanisms of evolved herbicide resistance. **Journal of Biology. Chemistry**, v. 295, p. 10307-10330, 2020.
- GOGGIN, D. E.; CAWTHRAY, G. R.; POWLES, S. B. 2, 4-D resistance in wild radish: reduced herbicide translocation via inhibition of cellular transport. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, p. 3223-3235, 2016.

GROSSMANN, K.; KWIATKOWSKI, J.; TRESCH, S. Auxin herbicides induce H₂O₂ overproduction and tissue damage in cleavers (*Galium aparine* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 1811–1816, 2001.

HATZI-HATZIOS, K.; HOCK, B.; ELSTNER, E. Metabolism and elimination of toxicants, 4th ed., by Hock B, Elstner EF, CRC Press, Boca Raton, p. 469–518, 2005.

Heap, I. M. International Survey of herbicides resistant weeds. <http://www.weedscience.com/> [accessed January 13, 2022].

Heap, I. M. International Survey of herbicides resistant weeds. <http://www.weedscience.com/><http://www.weedscience.com/>[accessed December 5 2021].

KNISS, A. R.; VASSIOS, J. D.; NISSEN, S. J.; RITZ, C. Nonlinear regression analysis of herbicide absorption studies. **Weed Science**, v. 59, p. 601-10, 2011.

LAFOREST, M., MARTIN, S.L., BISAILLON, K., SOUFIANE, B., MELOCHE, S. AND PAGE, E. A chromosome-scale draft sequence of the Canada fleabane genome. **Pest Management Science**, v. 76, p. 2158-2169, 2020.

LEAL, J. F. L.; SOUZA, A. D. S.; BORELLA, J.; ARAUJO, A. L. S.; LANGARO, A. C.; ALVES, M. M.; FERREIRA, L. J. S.; MORRAN, S.; ZOBIOLE, L. H. S.; LUCIO, F. R.; MACHADO, A. F. L.; GAINES, T. A.; PINHO, C. F. D. Rapid photosynthetic and physiological response of 2,4-D-resistant Sumatran fleabane (*Conyza sumatrensis*) to 2,4-D as a survival strategy. **Weed Science**, v. 70, p. 298-308, 2022.

LECLERE, S.; WU, C.; WESTRA, P.; SAMMONS, R. D. Cross-resistance to dicamba, 2,4-D, and fluroxypyr in *Kochia scoparia* is endowed by a mutation in an *AUX/IAA* gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, p. 2911-2920, 2018.

LESPÉRANCE, M. A. Programmed cell death and altered translocation cause glyphosate resistance in giant ragweed (*Ambrosia trifida* L.). Master of Science, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, 2016.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, p. 550, 2014.

MORETTI, M. L.; VAN HORN, C. R.; ROBERTSON, R.; SEGOBYE, K.; WELLER, S. C.; YOUNG, B. G.; JOHNSON, W. G.; DOUGLAS S. R.; WANG, D.; GE, X.; D'AVIGNON, A.; GAINES, T. A.; WESTRA, P.; GREEN, A. C.; JEFFERY, T.; LESPÉRANCE, M. A.; TARDIF, F. J.; SIKKEMA, P. H.; CHRISTOPHER, H. J.; MCLEAN, M. D.; LAWTON, M. B.; SCHULZ, B. Glyphosate resistance in *Ambrosia trifida*: Part 2. Rapid response physiology and non-target-site resistance. **Pest Management Science**, v. 74, p. 1079-1088, 2018.

OLIVEIRA, M. C.; GAINES, T. A.; DAYAN, F. E.; PATTERSON, E. L.; JHALA, A. J.; KNEZEVIC, S. Z. Reversing resistance to tembotrione in an *Amaranthus tuberculatus* (var. *rudis*) population from Nebraska, USA with cytochrome P450 inhibitors. **Pest Management Science**, v. 74, p. 2296-2305, 2018.

PALAVAN-UNSAI, N.; BUYUKTUNCER, E. D.; TUFEKCI, M. A. Programmed cell death in plants. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 4, p. 9-23, 2005.

PATRO, R.; DUGGAL, G.; LOVE, M. I.; IRIZARRY, R. A.; KINGSFORD, C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. **Nature Methods**, v. 14, p. 417-419, 2017.

PAZMIÑO, D. M.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; SANDALIO, L. M. Insights into the toxicity mechanism of and cell response to the herbicide 2,4-D in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, p. 425-427, 2012.

PETERSON, M. A.; MCMASTER, S. A.; RIECHERS, D. E.; SKELTON, J.; STAHLMAN, P. W. 2, 4-D past, present, and future: a review. **Weed Technology**, v. 30, p. 303-45, 2016.

PETROV, V.; HILLE, J.; MUELLER-ROEBER, B.; GECHEV, T. S. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. **Frontier in Plant Science**, v. 6, p. 69, 2015.

PETTINGA, D. J.; OU, J.; PATTERSON, E. L.; JUGULAM, M.; WESTRA, P.; GAINES, T. A. Increased Chalcone Synthase (CHS) expression is associated with dicamba resistance in *Kochia scoparia*. **Pest Management Science**, v. 74, n. 10, p. 2306-2315, 2018.

PINHO, C. F.; LEAL J. F. L.; SOUZA A. S.; OLIVEIRA G. F. P. B.; OLIVEIRA, C.; LANGARO, A. C.; ET AL. First evidence of multiple resistance of Sumatran Fleabane (*Conyza sumatrensis*(Retz.) E. Walker) to five-mode-of-action herbicides. **Australian Journal Crop Science**, v. 13, n. 10, p. 1688, 2019.

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

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available online at <https://www.R-project.org/>.

REAPE, T. J.; MCCABE, P. F. Apoptotic-like programmed cell death in plants. **New Phytologist**. v.180, p. 13-26, 2008.

REY-CABALLERO, J.; MENÉNDEZ, J.; GINÉ-BORDONABA, J.; SALAS, M.; ALCÁNTARA, R.; TORRA, J. Unravelling the resistance mechanisms to 2,4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) in corn poppy (*Papaver rhoeas*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.133, p. 67-72, 2016.

RIAR, D. S.; NORSWORTHY, J. K.; JHONSON, D. B.; SCOTT, R. C.; BAGAVATHIANNAN, M. Glyphosate resistance in Johnsongrass (*Sorghum halepense*) biotype from Arkansas. **Weed Science**, v. 59, p. 229-304, 2011.

TAKANO, H.; OLIVEIRA JR.; CONSTANTIN, J.; BIFFE, D.; FRANCHINI, L. H.; BRAZ, G.; RIOS, F.; GHENO, E. E.; GEMELLI, A. Efeito da adição do 2,4-D ao glyphosate para o controle de espécies de plantas daninhas de difícil controle. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 12, p. 1-13, 2013.

TORRA, J.; ROJANO-DELGADO, A. M.; REY-CABALLERO, J.; ROYO-ESNAL, A.; SALAS, M. L.; DE PRADO, R. Enhanced 2,4-D metabolism in two resistant *Papaver rhoeas* populations from Spain. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1584, 2017.

VAN HORN, C. R.; MORETTI, M. L.; ROBERTSON, R. R.; SEGOBYE, K.; WELLER, S. C.; YOUNG, B. G.; JOHNSON, W. G.; SCHULZ, B.; GREEN, A. C.; JEFFERY, T.; LESPÉRANCE, M. A. Glyphosate resistance in *Ambrosia trifida*: Part 1. Novel rapid cell death response to glyphosate. **Pest Management Science**, v. 74, p. 1071-1078, 2018.

WEAVER, S. E. The biology of Canadian weeds. 115. *Conyza canadensis*. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 81, n. 4, p. 867-875, 2001.

WERCK-REICHHART, D.; HEHN, A.; DIDIERJEAN, L. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 116-23, 2000.

YANG, Y.; HAMMES, U. Z.; TAYLOR, C. G.; SCHACHTMAN, D. P.; NIELSEN, E. High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. **Current Biology**, v. 16, p. 1123-7, 2006.

ZHU, A.; IBRAHIM, J. G.; LOVE, M. I. Heavy-tailed prior distributions for sequence count data: removing the noise and preserving large differences. **Bioinformatics**, v. 35, p. 2084-92, 2019.

5 CAPÍTULO III

MANEJO EM PÓS-EMERGÊNCIA DE *Conyza sumatrensis* RESISTENTE AO HERBICIDA 2,4-D

RESUMO

Estratégias de manejo são essenciais no controle de plantas daninhas resistentes a herbicidas. O objetivo da pesquisa foi avaliar a eficácia de herbicidas auxínicos aplicados de forma isolada e nas modalidades de aplicação sequencial e em associação para controle de *Conyza sumatrensis* resistente ao herbicida 2,4-D. Foram realizados experimentos em casa-de-vegetação (E1) e campo (E2). No E1, os tratamentos foram aplicados em plantas com 12-15 folhas, e foram compostos por: testemunha (sem aplicação), os herbicidas isolados glifosato (720 g ia ha⁻¹); 2,4-D (1005 g ia ha⁻¹); triclopir (720 g ia ha⁻¹); halauxifen-metil+diclosulam (5,17+25,5 g ia ha⁻¹) e dicamba (480 g ia ha⁻¹); os herbicidas auxínicos em associação com glifosato (720 g ia ha⁻¹), as mesmas associações com adição de saflufenacil (35g ia ha⁻¹) ou sequencial de glufosinato de amônio (400 g ia ha⁻¹) aplicado 10 dias após a primeira aplicação (DAPA). As 4 e 48 horas, 10, 15 e 35 DAPA realizou-se análise de controle visual e aos 35 DAPA a análise de massa seca da parte aérea das plantas. No E2, os tratamentos foram aplicados com plantas de 30-40 cm os tratamentos foram compostos por: testemunha (sem aplicação); os herbicidas 2,4-D (1005 g ia ha⁻¹); triclopir (720 g ia ha⁻¹); halauxifen-metil+diclosulam (6,5+31,8g ia ha⁻¹) e dicamba (384g ia ha⁻¹) em associação com o glifosato (1200 g ea ha⁻¹); as mesmas associações com adição de saflufenacil (35g ia ha⁻¹) ou sequencial de glufosinato de amônio (400 g ia ha⁻¹) aos 8 DAPA. Aos 14 e 50 DAPA foram realizadas análises visuais de controle. Os dados foram submetidos a ANOVA ($p < 0,05$) e comparados por Scott-knott ($p < 0,05$). Os herbicidas auxínicos, exceto 2,4-D, foram eficientes no controle do biótipo de buva no E1. A associação com saflufenacil, para todos os herbicidas avaliados, foi excelente na velocidade de controle no E1 e E2. O glufosinato de amônio em sequencial aos demais herbicidas proporcionou controle satisfatório das plantas, exceto para o tratamento glifosato+2,4-D no E2. O estágio de desenvolvimento das plantas foi determinante nos controles observados nos experimentos. A aplicação dos herbicidas em associação e sequencial se mostrou uma excelente opção de manejo para o controle de biótipos de buva resistente ao herbicida 2,4-D.

Palavras-chave: controle, associação, sequencial, dicamba, halauxifen-metil+diclosulam, triclopir.

ABSTRACT

Management strategies are essential in the control of resistant weeds. The objective of the research was to evaluate the efficacy of auxinic herbicides applied in isolation and in sequential and mixed application modalities to control *Conyza sumatrensis* resistant to the herbicide 2,4-D. Experiments were carried out in greenhouse (E1) and field (E2). In E1, the treatments were applied to plants with 12-15 leaves, and were composed by: untreated (without application), the isolated herbicides: glyphosate (720 g ae ha⁻¹); 2,4-D (1005 g ae ha⁻¹); triclopyr (720 g ai ha⁻¹); halauxifen-methyl + diclosulam (5.17 + 25.5 g ai ha⁻¹) and dicamba (480 g ai ha⁻¹); the auxinic herbicides in a associate with glyphosate (720 g ae ha⁻¹), the same associate with saflufenacil (35 g ia ha⁻¹) or sequential of ammonium glufosinate (400 g ai ha⁻¹) applied 10 days after the first application (DAFA). At 4 and 48 hours, 10, 15 and 35 DAFA, visual control analysis was performed and at 35 DAFA the dry mass of the shoot. In E2, the treatments were applied with plants of 30-40 cm. The treatments were composed by control (without application); 2,4-D herbicides (1005 g ae ha⁻¹); triclopyr (720 g ai ha⁻¹); halauxifen-methyl + diclosulam (6.5 + 31.8g ia ha⁻¹) and dicamba (384g ia ha⁻¹) associate with glyphosate (1200 g ea ha⁻¹); the same associate with saflufenacil (35g ai ha⁻¹) or sequential of ammonium glufosinate (400 g ai ha⁻¹) at 8 DAFA. At 14 and 50 DAPA, visual control analyzes were performed. The data were analyzed by ANOVA (p <0.05), tested by Scott-knott (p <0.05). Auxinic herbicides, except 2,4-D, were efficient in controlling the biotype of the fleabane in E1. The association with saflufenacil, for all herbicides evaluated, was excellent in the control speed in E1 and E2. Ammonium glufosinate in sequence to the other herbicides provided satisfactory control of the plants, except for the treatment glyphosate + 2,4-D in E2. The stage of development of the plants was decisive in the controls observed in the experiments. The application of herbicides in combination and sequentially proved to be an excellent management option for the control of resistant biotype of 2,4-D herbicide.

Keywords: control, association, sequential, dicamba, halauxifen-metil+diclosulam, triclopir.

5.1 INTRODUÇÃO

O manejo de plantas daninhas resistentes nas lavouras onera os custos de produção podendo estes serem superiores a 42% quando há infestações isoladas de buva em lavoura de soja (ADEGAS et al., 2013). O problema é agravado quando há casos de plantas daninhas com resistência múltipla, sendo este um alerta ao uso de herbicidas de forma intensiva e repetitiva. Atualmente foram relatados 20 casos de *Conyza sumatrensis* (buva) com resistência, sendo 13 do tipo simples, 2 do tipo cruzada e 5 com resistência múltipla (HEAP, 2021). O pior cenário foi relatado no ano de 2017, para um biótipo de buva com resistência múltipla aos herbicidas 2,4-D, diuron, glifosato, paraquat e saflufenacil (PINHO et al., 2019), no Brasil.

A buva é considerada uma das plantas daninhas mais problemática, danosa, agressiva e cosmopolita (BAJWA et al., 2016), onde a perturbação mínima do solo, no caso o sistema de plantio direto, associada ao pousio proporcionou um nicho favorável para a adaptação ecológica da espécie (MURPHY & LEMERLE, 2006). As espécies de *Conyza* spp. possuem propagação unicamente através de sementes, sendo plantas muito prolíficas, com produções de sementes superiores a 300.000 por planta (GREEN, 2011). Sendo assim, as recomendações de manejo de áreas infestadas com buva visam o rápido controle, de modo que os biótipos não cheguem à produção de sementes, evitando assim infestações futuras. Em vista da seleção de plantas daninhas resistentes as opções de manejo para o controle da buva com resistência múltipla tornam-se limitadas.

A utilização de herbicidas de diferentes mecanismos de ação e com semelhantes espectros de controle podem aumentar a eficiência no manejo de plantas daninhas, sendo esta aplicação realizada em associação e/ou sequencial. A aplicação de herbicidas em associação é uma estratégia utilizada em práticas agrícolas, que consiste na associação de agrotóxicos e afins no tanque de pulverização realizada imediatamente antes da pulverização (GAZZIERO, 2015). A aplicação de herbicidas em sequencial, consiste na aplicação dos herbicidas separados com determinado intervalo de tempo, que vai depender da espécie alvo e das condições ambientais. A aplicação de herbicidas em associação ou sequencial é amplamente utilizada na dessecação de plantas daninhas, devido ao maior espectro de controle (OLIVEIRA JR et al., 2015), além de prevenir o surgimento de biótipos resistentes (OWEN & ZELAYA, 2005).

A utilização de herbicidas auxínicos junto com glifosato é uma importante ferramenta no controle de plantas daninhas, sendo uma das associações de herbicidas mais utilizada na dessecação pré-semeadura da cultura da soja no Brasil. Isto ocorre devido a eficácia desta associação e amplo espectro de controle sobre folhas largas de difícil controle, especialmente aquelas resistentes ou tolerantes ao glifosato (TAKANO et al., 2013). Os herbicidas auxínicos são classificados em quatro grupos químicos: ácido benzoico (dicamba), ácido ariloxialcanico (2,4-D), ácido piridiniloxialcanoico (triclopir) e arylpicolinato (halauxifen-metil), e agem de forma similar no controle de plantas daninhas (EPP et al., 2016). Contudo, as auxinas apresentam afinidade de ligação diferente na proteína receptora Auxin Binding Protein 1 (ABP1) presentes na membrana plasmática (GLEASON et al., 2011; CHRISTOFFOLETI et al., 2015), além de possuírem diferenças relacionadas geralmente a velocidade de controle, fator que também é dependente da espécie alvo e estágio da planta daninha.

Com a resistência de *Conyza sumatrensis* aos herbicidas glifosato e 2,4-D (PINHO et al., 2019), a principal estratégia de manejo utilizada por longos anos, sobretudo em dessecação pré-semeadura, torna-se ineficiente. Sendo assim, estudos sobre a adoção de medidas alternativas de controle que reduzam a pressão de seleção sobre os biótipos resistentes se torna necessária. Dentre as possíveis estratégias de controle, estão a associação ou sequencial dos herbicidas glifosato+auxinas com um herbicida de contato, como paraquat, paraquat + diuron, saflufenacil ou glufosinato de amônio (WERTH et al., 2010; ZOBIOLE et al., 2018).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar a resistência cruzada entre os herbicidas auxínicos, assim como a eficácia dos herbicidas auxínicos aplicados de forma isolada e nas modalidades de associação ou sequencial para controle de *Conyza sumatrensis* resistente ao herbicida 2,4-D.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos para comparar estratégias de controle de buva. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação (E1) e a campo (E2).

O E1 foi conduzido em casa-de-vegetação e o biotipo de buva (*Conyza sumatrensis*) utilizado no ensaio é originado da cidade de Assis Chateaubriand/PR, Brasil (-24°16'53.8"S, -53°30'47.5"W), e apresenta resistência comprovada aos herbicidas paraquat, saflufenacil, diuron, 2,4-D e glifosato (Pinho et al., 2019).

As unidades experimentais foram compostas por vasos com capacidade de 0,35L preenchidos com substrato do tipo comercial e quando as plantas atingiram o estágio de 12-15 folhas (10-12 cm) foram iniciadas as aplicações dos tratamentos. Os herbicidas foram aplicados com um pulverizador costal pressurizado a CO₂, trabalhando a uma pressão de 2.8 bar, equipado com quatro pontas XR110.020, espaçados entre si a 0,5 m, com volume de calda de 150 L ha⁻¹.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizados com 17 tratamentos mais testemunha sem aplicação e quatro repetições, totalizando 72 unidades experimentais. As aplicações dos herbicidas foram realizadas de forma isolada e nas modalidades associada e sequencial (Tabela 1), sendo esta última realizada 10 dias após a primeira aplicação.

Tabela 1. Tratamentos avaliados para o controle do biótipo de buva (*Conyza sumatrensis*) no estágio de 12-15 folhas e suas respectivas doses no Experimento 1 (E1). PDPA/UFRRJ, 2022.

Tratamentos	Representação	Dose (g ia ha ⁻¹ ou g ea ha ⁻¹)
Testemunha	Test	-
Glifosato	Glif	720
2,4-D	2.4-D	1005
2,4-D+Glifosato	2.4-D+Gli	1005+720
2,4-D+Glifosato > Glufosinato de amônio**	2.4-D+Gli>Gluf	1005+720+400
2,4-D+Glifosato+saflufenacil*	2.4-D+Gli+Saf	1005+720+35
Triclopir	Tri	720
Triclopir+Glifosato	Tri+Gli	720+720
Triclopir+Glifosato > Glufosinato de amônio**	Tri+Gli>Gluf	720+720+400
Triclopir+Glifosato+Saflufenacil*	Tri+Gli+Saf	720+720+35
Halauxifen-metil+diclosulam***	HD	5,17+25,5
Halauxifen-metil+diclosulam+Glifosato***	HD+Gli	5,17+25,5+720
Halauxifen-metil+diclosulam+Glifosato> Glufosinato de amônio** ***	HD+Gli>Glu	5,17+25,5+720+400
Halauxifen-metil+diclosulam+Glifosato+Saflufenacil*	HD+Gli+Saf	5,17+25,5+720+35
Dicamba	Dic	480
Dicamba+Glifosato	Dic+Gli	480+720
Dicamba+Glifosato > Glufosinato de amônio**	Dic+Gli>Glu	480+720+400
Dicamba+Glifosato+Saflufenacil*	Dic+Gli+Saf	480+720+35

* Adicionado adjuvante Dash 0,5% a calda de aplicação. **Aplicação do herbicida Glufosinato de amônio em sequencial (10 dias após primeira aplicação). *** Adicionado Aureo® 0,5% v/v. Glifosato (Roundup Original); 2,4-D (DMA 806 BR); Glufosinato de amônio (Finale ®); Triclopir (Triclon); Halauxifen-metil+diclosulam (GF-3220), Dicamba (Atectra®); Saflufenacil (Heat ®).

Foram realizadas análises visuais de controle as 4 e 48 horas e aos 10, 15 e 35 dias após a primeira aplicação (DAPA). A análise visual de controle foi realizada através de notas que variam de 0 a 100%, onde 0% representa a ausência de sintomas e 100% a morte da planta (Frans, 1986).

Aos 35 DAPA, as plantas foram coletadas e a parte aérea separada, acondicionada em sacos de papel e transferidas para uma estufa de circulação forçada de ar em temperatura de 55±5°C até atingirem massa constante, para determinação da massa seca de parte aérea (MSPA).

O E2 foi realizado no período de outubro a novembro de 2018, em estação experimental. A área experimental utilizada apresentava 15-20 plantas de buva/m² em estágio avançado de desenvolvimento (30 – 40 cm), com suspeita de resistência aos herbicidas 2,4-D e glifosato. As aplicações dos tratamentos foram realizadas com um pulverizador costal pressurizado a CO₂, trabalhando a uma pressão de 2.8 bar, equipado com quatro pontas XR 110.020, espaçados entre si a 0,5 m, com volume de calda de 200 L ha⁻¹.

O delineamento experimental foi de blocos casualizados com 12 tratamentos mais testemunha sem aplicação e quatro repetições, totalizando 52 unidades experimentais. As unidades experimentais foram compostas por parcelas de 3 x 8 m (24 m²), sendo adotado 2,5 x 8 m como área útil (unidade de observação) e as aplicações dos herbicidas foram realizadas nas modalidades de associada e sequencial (Tabela 2), sendo esta última realizada 8 dias após a primeira aplicação

Tabela 2. Tratamentos avaliados para o controle do biótipo de buva (*Conyza sumatrensis*) no estádio de 30 – 40 cm e suas respectivas doses, no Experimento 2 (E2). PDPA/UFRRJ, 2022.

Tratamentos	Representação	Doses (g ia ha ⁻¹ ou g ea ha ⁻¹)
Testemunha	Test	-
Glifosato+2,4-D ¹	Gli+2,4-D	1200+1005
Glifosato+2,4-D+Saflufenacil ²	Gli+2,4-D+Saf	1200+1005+35
Glifosato+2,4-D>Glufosinato*	Gli+2,4-D>Gluf	1200+1005+600
Glifosato+Triclopir ³	Gli+Tri	1200+720
Glifosato+Triclopir+Saflufenacil ²	Gli+Tri+Saf	1200+720+35
Glifosato+Triclopir>Glufosinato de amônio*	Gli+Tri>Gluf	1200+720+600
Glifosato+Halauxifen-metil+diclosulam ⁴	Gli+ HD	1200+6,5+31,8
Glifosato+Halauxifen-metil+diclosulam+Saflufenacil ²	Gli+ HD+Saf	1200+6,5+31,8+35
Glifosato+Halauxifen-metil+diclosulam>Glufosinato de amônio*	Gli+ HD>Gluf	1200+6,5+31,8+600
Glifosato+Dicamba ⁵	Gli+Dic	1200+384
Glifosato+Dicamba+Saflufenacil ²	Gli+Dic+Saf	1200+384+35
Glifosato+Dicamba>Glufosinato de amônio*	Gli+Dic>Gluf	1200+384>600

*A aplicação de glufosinato de amônio foi realizada em sequencial 8 dias após a primeira aplicação dos herbicidas, com a adição de Aureo® 0,2% v/v. ¹Adição de Assist® 0,25% v/v. ²Adição de Dash® 1,0% v/v. ³ Adição de Assist® 0,5% v/v. ⁴ Aureo® 0,5% v/v. ⁵Adição de Aureo® 0,25% v/v. Glifosato (Glizmax Prime); 2,4-D (DMA 806 BR); Saflufenacil (Heat ®); glufosinato de amônio (Finale ®); Triclopir (Triclon); Halauxifen-metil+diclosulam (GF-3220); Dicamba (Aectra ®)

Foram realizadas análises visuais de controle aos 14 e 50 (DAPA). A análise visual de controle se deu através de notas que variam de 0 a 100%, onde 0% representa a ausência de sintomas e 100% a morte da planta (Frans, 1986).

Os dados gerados em ambos os experimentos foram submetidos a análise de variância ($p < 0,05$), e sendo F significativo, os dados foram testados por Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o E1, a maioria dos herbicidas isolados, em associação e sequencial, foram eficazes no controle do biótipo de buva avaliado, exceto para a os herbicidas glifosato, 2,4-D e a associação dos herbicidas 2,4-D+glifosato (Tabela 3). Este resultado já era esperado, visto que o biótipo avaliado apresenta resistência aos herbicidas glifosato e 2,4-D previamente reportada (PINHO et al., 2019). As plantas sob aplicação dos herbicidas triclopir, dicamba e da mistura comercial halauxifen-metil+diclosulam apresentaram sintomas característicos dos herbicidas auxínicos 24hs após primeira aplicação e aos 35 dias após primeira aplicação morte das plantas (Tabela 3, Figura 1). Os sintomas dos herbicidas auxínicos podem ser divididas em três etapas, que incluem: 1) sintoma anormal de crescimento, incluindo epinastia foliar, dilatação dos tecidos e início de ondulação do caule; 2) inibição do crescimento da raiz, diminuição do alongamento do internódio e da área foliar e intensificação da pigmentação das folhas, e; 3) clorose, senescência, murcha e necrose foliar (GROSSMANN, 2009).

Tabela 3. Percentual de controle as 4 e 48 horas e aos 10, 15 e 35 DAPA e massa seca da parte aérea aos 35 DAPA dos herbicidas isolados e nas modalidades associada e sequencial em biótipos de buva (*Conyza sumatrensis*), no E1. PDPA/UFRRJ, 2022.

Tratamentos	% Controle										MSPA	
	4		48		10		15		35		35	
	Horas após primeira aplicação		Horas após primeira aplicação		Dias após primeira aplicação (DAPA)							
Test	0	e	0	I	0	h	0	g	0	e	3.38	a
Glif	0	e	6	h	15	g	14	f	11	d	1.81	b
2.4-D	54	d	75	d	63	f	65	e	50	b	0.67	c
2.4-D+Gli	64	c	84	c	90	b	73	d	45	c	0.71	c
2.4-D+Gli>Gluf	69	b	89	b	88	b	94	b	100	a	0	d
2.4-D+Gli+Saf	79	a	97	a	100	a	100	a	100	a	0	d
Tri	1	e	37	f	69	e	75	d	100	a	0	d
Tri+Gli	0	e	46	e	80	c	84	c	100	a	0	d
Tri+Gli>Gluf	0	e	44	e	83	c	90	b	100	a	0	d
Tri+Gli+Saf	6	e	96	a	100	a	100	a	100	a	0	d
HD	0	e	20	g	75	d	90	b	100	a	0	d
HD+Gli	0	e	39	f	76	d	89	b	100	a	0	d
HD+Gli>Glu	0	e	40	f	74	d	81	c	100	a	0	d
HD+Gli+Saf	0	e	95	a	100	a	100	a	100	a	0	d
Dic	0	e	41	e	74	d	79	c	100	a	0	d
Dic+Gli	0	e	36	f	78	d	85	c	100	a	0	d
Dic+Gli>Glu	0	e	35	f	73	d	81	c	100	a	0	d
Dic+Gli+Saf	2	e	95	a	100	a	100	a	100	a	0	d
CV (%)	25.8		7.7		5.2		4.8		2.7		66.9	

Letras minúsculas iguais na coluna não se diferem pelo teste de Scott-knott ao nível de 5%.

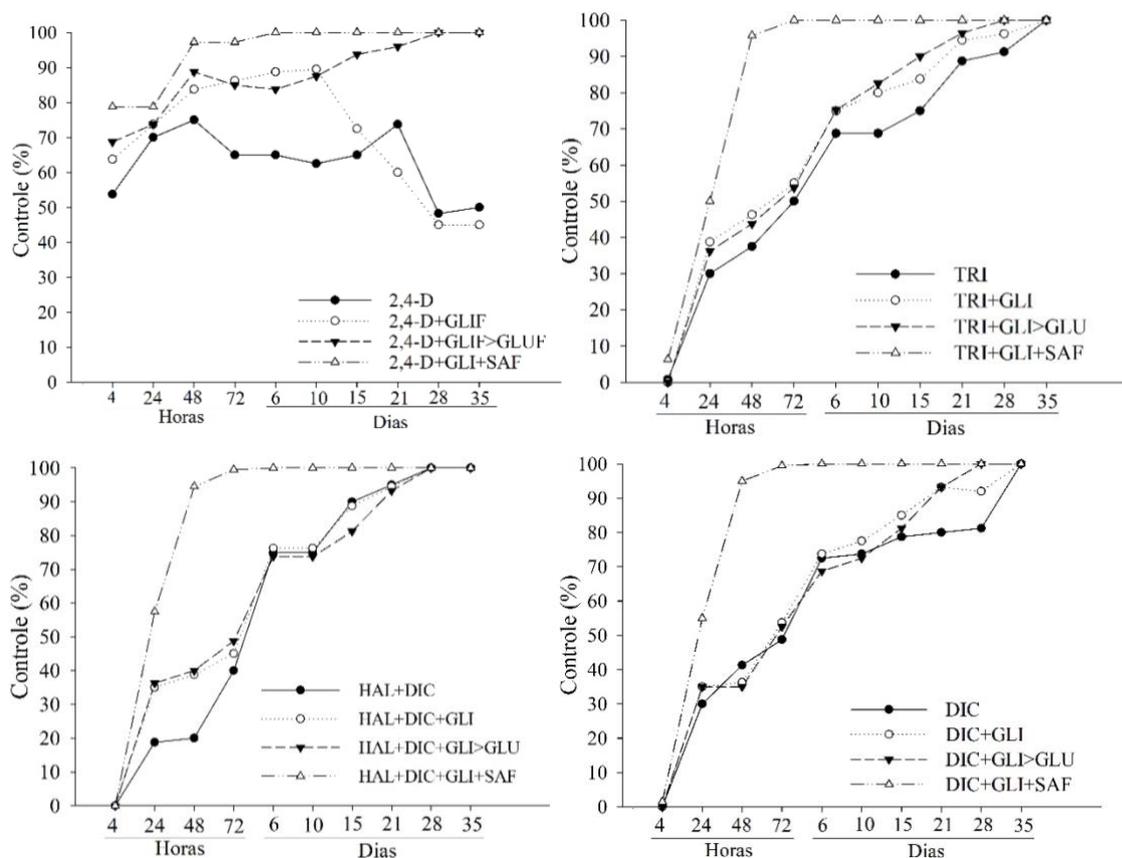


Figura 1. Evolução dos sintomas nos biótipos de buva (*Conyza sumatrensis*) submetidas a aplicação dos herbicidas auxínicos isolados e nas modalidades associação com o herbicida glifosato e saflufenacil e no sequencial com o herbicida glufosinato 10 dias após a primeira aplicação, no E1 Legenda: TRI: Triclopir; HAL+DIC: Halauxifen-metil+diclosulam-; DIC: Dicamba; GLI: Glifosato-; SAF: Saflufenacil; GLU: Glufosinato. PDPA/UFRRJ, 2022.

Os herbicidas triclopir, dicamba e a mistura comercial halauxifen-metil+diclosulam foram eficientes no controle dos biótipos de buva sugerindo que o biótipo não apresenta resistência cruzada aos herbicidas auxínicos avaliados. Os mecanismos subjacentes conferindo resistência cruzada aos herbicidas auxínicos ainda não são totalmente esclarecidos e variam em função do grupo químico dos herbicidas e espécie de planta daninha. O controle eficiente dos herbicidas auxínicos podem estar relacionados com a as diferentes estruturas químicas apresentadas pelas moléculas que podem aumentar ou diminuir a sua permeabilidade na célula (WALSH et al., 2006). Além disso, a especificidade química dos herbicidas auxínicos podem ser intercedidas por diferentes proteínas receptoras, como observado em estudos anteriores, onde o genoma de *Arabidopsis* codifica cinco homólogos de TIR1, que possuem afinidade diferente entre as auxinas sintéticas e naturais (GROSSMANN, 2010; WALSH et al., 2006). Como consequência, as diferentes afinidades de ligações das auxinas reduzem a chance de resistência cruzada (GLEASON et al., 2011), como observado neste estudo.

LeClere et al. (2018) observou uma mutação pontual de nucleotídeos de uma região altamente conservada de uma proteína em *Kochia scoparia* conferindo resistência cruzada a dicamba, 2,4-D e fluroxipir. Há relatos na literatura que apontam resistência cruzada aos herbicidas auxínicos em *Bassia scoparia* a dicamba e fluroxypyr (KUMAR et al., 2019), em *Chenopodium álbum* resistente aos herbicidas picloram, aminopyralid e dicamba (GHANIZADEH E HARRINGTON, 2016), em *Galium spurium* aos herbicidas MCPA, dicamba, picloram, fluroxypyr e triclopir (Van Eerd et al. (2005) e em *Sinapis arvensis* aos herbicidas 2,4-D, mecoprop e picloram (HEAP E MORRISON, 2002).

Além disso, os biótipos de buva com resistência ao herbicida 2,4-D que vem sendo diagnosticados no Brasil apresentam sintoma atípico quando submetido a aplicação do herbicida, fenômeno denominado de “rápida resposta fisiológica”. Esta característica esta potencialmente associada ao mecanismo de resistência de buva ao 2,4-D (Queiroz et al., 2020), onde as plantas apresentam pontuações necróticas, assemelhando-se a uma resposta da hipersensibilidade da planta ao herbicida. Este sintoma atípico foi observado nas plantas do E1 submetidas a todos os tratamentos com herbicida 2,4-D, onde as 4 horas após primeira aplicação do herbicida 2,4-D já foi possível observar um alto nível de controle (injúria) no biótipo avaliado, uma vez que, as plantas apresentaram a rápida resposta fisiológica ao herbicida (Tabela 3, Figura 1). O aparecimento de rápida resposta fisiológica pode ser um alerta no campo, para diagnosticar precocemente plantas resistentes ao herbicida 2,4-D. Entretanto, a partir dos 15DAPA para os tratamentos com 2,4-D isolado e glifosato+2,4-D, é possível observar a recuperação das plantas e redução do percentual de controle (Figura 1). Após a rápida resposta fisiológica, as folhas tratadas secam enquanto não são observados sintomas necróticos nos primórdios foliares, o que permite o restabelecimento do crescimento pela gema apical e brotações axilares, tornando o controle pelos herbicidas ineficiente

A aplicação dos herbicidas, triclopir, dicamba e da mistura comercial halauxifen-metil+diclosulam, em associação com o herbicida glifosato, proporcionou aumento na velocidade de controle das plantas daninhas, quando comparada a aplicações isoladas. Para estes herbicidas em associação com glifosato, as 24 HAA foi observado controle acima de 30%, aos 21 DAPA controle acima de 90%, e aos 35 DAPA controle de 100%. Os herbicidas auxínicos em associação com o herbicida glifosato, são amplamente utilizados em áreas de dessecação pré-semeadura no Brasil, devido ao amplo espectro de controle. Outras pesquisas mostram a importância da associação entre glifosato e herbicidas auxínicos para o controle de plantas daninhas resistentes ou tolerantes a herbicidas. Para a espécie *Amaranthus tabernáculos*, quando o herbicida dicamba foi aplicado em associação ao herbicida glifosato houve aumento no controle do biótipo (SPAUNHORST & BRADLEY, 2013). Para as espécies de *Commelina benghalensis*, *Richardia brasiliensis*, *Euphorbia heterophylla*, *Spermacoce latifolia*, *Ipomoea grandifolia* e *Conyza* spp, a associação do herbicida 2,4-D ao glifosato, também foi determinante na eficiência e na velocidade de controle, sendo observado efeito sinérgico a associação (TAKANO et al., 2013).

Embora tenha sido observado um controle eficiente das plantas de buva na aplicação isolada de triclopir, dicamba e halauxifen-metil+diclosulam e em associação com o glifosato, estas quando comparadas a aplicação destes herbicidas em associação com saflufenacil ou com sequencial de glufosinato de amônio, apresentam menor velocidade de controle (Figura 1). Aos 5 dias após a aplicação do sequencial as plantas apresentaram controle superior a 80%, como apresentado na Figura 1, chegando a 100% aos 25 dias após a aplicação do sequencial (35DAPA). A associação dos herbicidas auxínicos com glifosato e saflufenacil no controle do biótipo resistente se mostrou rápida e eficiente. Apesar do biótipo ser comprovadamente resistente aos herbicidas 2,4-D, glifosato e saflufenacil, obteve-se controle de 100% quando esses foram usados em associação.

A velocidade de controle, principalmente para o manejo de dessecação pré-semeadura das culturas, é um fator que deve ser levado em consideração devido ao pouco tempo disponível para estas operações no campo. A aplicação do herbicida glifosato em associação com o saflufenacil, ao contrário de outros herbicidas inibidores da PROTOX, apresenta controle significativo, já que o saflufenacil possui propriedades físico-químicas que permitem a sua mobilidade via floema (ASHIGH & HALL, 2010). As características do herbicida saflufenacil como pka de 4,41 e log kow de 2,6 e carácter de ácido fraco, lhe permite distribuição sistêmica (GROSSMANN et al. 2011).

Além da associação de herbicidas em tanque, a aplicação sequencial é uma ótima opção de manejo utilizada no controle de plantas resistentes ou tolerantes a herbicidas. A aplicação de herbicidas em sequencial, além de incrementar a velocidade de controle, também tem como vantagem o controle de novos fluxos de emergência de plantas daninhas que ocorrem logo após a primeira aplicação (SPERRY et al., 2017). O glufosinato de amônio é um herbicida eficaz no manejo de plantas de difícil controle e tem sido amplamente utilizado como estratégia de controle de *Conyza* spp. resistente no Brasil, principalmente em aplicações sequenciais.

No E2, o uso dos herbicidas auxínicos em associação com o herbicida glifosato aos 50 dias após a primeira aplicação apresentaram controle de 65, 89, 83 e 85% respectivamente para as associações dos herbicidas glifosato+2,4-D; glifosato+triclopir, glifosato+halauxifenmetil+diclosulam e glifosato+dicamba (Tabela 4), não sendo considerado um controle satisfatório. O baixo nível de controle observado nestas associações pode estar relacionado ao estágio fenológico das plantas de buva no momento da aplicação, que se encontravam com 30-40 cm de altura. O controle eficiente de plantas daninhas com uso de herbicidas em pós-emergência é dependente do estágio fenológico no momento da aplicação, pois este afeta características como absorção e translocação dos herbicidas pela planta, onde plantas em estágio avançado de desenvolvimento apresentam características anatômicas que reduzem a absorção e alteram a sensibilidade das plantas a herbicidas. Para as espécies *Conyza bonariensis* e *Conyza canadenses* em estágio de pré-florescimento, foi relatado menor controle quando utilizados os herbicidas glifosato e paraquat em dessecação (Moreira et al., 2010).

Tabela 4. Percentual de controle aos 14 e 50 dias após primeira aplicação (DAPA) dos herbicidas nas modalidades associada e sequencial em biótipos de buva (*Conyza sumatrensis*), no E2. PDPA/UFRRJ, 2022.

Tratamentos	% Controle			
	14 DAPA		50 DAPA	
Test	0	c	0	d
Gli+2,4-D	13	c	65	c
Gli+2,4-D+Saf	75	a	97	a
Gli+2,4-D>Gluf	71	a	88	b
Gli+Tri	13	c	89	b
Gli+Tri+Saf	71	a	99	a
Gli+Tri>Gluf	91	a	99	a
Gli+ HD	30	b	90	b
Gli+ HD+Saf	76	a	96	a
Gli+ HD>Gluf	81	a	96	a
Gli+Dic	30	b	85	b
Gli+Dic+Saf	73	a	97	a
Gli+Dic>Gluf	81	a	95	a
CV (%)	12.3		6.4	

Letras minúsculas iguais na coluna não se diferem pelo teste de Scott-knott ao nível de 5%

Com relação a associação de glifosato com os herbicidas 2,4-D, triclopir, halauxifen+diclosulan e dicamba, em associação com saflufenacil, no E2 aos 50 DAPA, foram obtidos controles superiores a 95%. A eficácia da adição de saflufenacil a calda do herbicida glifosato, já havia sido observada para as espécies *Commelina benghalensis* e *Ipomoea triloba* (CASTRO et al., 2017). O controle mais rápido proporcionado pela adição do saflufenacil a calda de herbicidas auxínicos, associados ao glifosato, pode ser uma excelente opção,

dependendo do sistema de manejo do produtor e período disponível para a dessecação. O manejo antecipado de plantas daninhas, traz diversos benefícios quando realizado de forma eficiente, principalmente para evitar atrasos na semeadura da cultura. Os herbicidas auxínicos e glifosato possuem características sistêmicas e seus efeitos na planta são lentos quando comparado aos herbicidas de contato, como é o caso do saflufenacil. Sendo, assim a associação destes dois herbicidas, com outros de ação mais rápida (CONSTANTIN et al., 2005) como o saflufenacil, possibilita o incremento e antecipação do controle da buva, disponibilizando a área “limpa” para a semeadura da cultura mais rapidamente.

No E2 aos 50 DAPA, as associações com glifosato+2,4-D, glifosato+triclopir, glifosato+halauxifen-metil+diclosulam e glifosato+dicamba, que receberam o herbicida glufosinato de amônio no sequencial (14 DAPA) apresentaram percentual de controle de 88, 99,5, 87 e 94,5%, respectivamente; evidenciando a eficácia do herbicida no sequencial. O herbicida glufosinato de amônio está sendo utilizado com um potencial substituto do herbicida paraquat, especialmente para folhas largas, após o banimento do herbicida paraquat no Brasil.

Neste trabalho, quando aplicado os herbicidas auxínicos isolados os melhores controles foram observados no E1, onde as plantas de buva estavam no estágio correto de manejo (10-12 folhas) no momento da aplicação dos herbicidas. Já no E2 as plantas estavam em estágio avançado de desenvolvimento (aproximadamente 40 cm), o que pode ter prejudicado o controle, especialmente com o uso dos herbicidas isolados ou nas associações dos herbicidas 2,4-D, triclopir, halauxifen-metil+diclosulam e dicamba ao herbicida glifosato. Resultados semelhantes foram observados nas espécies de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*, os autores analisaram o efeito do glifosato nos estágios roseta, quando as plantas atingiram de 10-15cm e florescimento e foi observado menor sensibilidade da planta ao herbicida no estágio mais avançado de desenvolvimento (GONZÁLEZ-TORRALVA et al., 2012). Sendo assim, o estágio de desenvolvimento na aplicação deve ser considerado uma ferramenta importante para um manejo eficiente e com menor uso de herbicidas.

As aplicações em associação e sequencial em ambos os experimentos foram excelentes opções de manejo. As aplicações em associação apresentam menor custo (quando comparadas ao sequencial), antecipam o controle das plantas, além de evitar novos casos de resistência de plantas daninhas pela alta eficácia; podendo ser considerada uma opção de manejo para o controle de biótipos de buva resistente a herbicidas. Já a aplicação em sequencial além de antecipar o controle das plantas daninhas, embora apresente um custo mais elevado devido a necessidade de uma nova operação na área, controla novos fluxos de emergência das plantas que podem ocorrer entre a primeira e a segunda aplicação, o que pode ser necessário dependendo do banco de sementes presente na área de cultivo.

5.4 CONCLUSÕES

A aplicação dos herbicidas triclopir, halauxifen-metil+diclosulam e dicamba apresentaram excelente controle do biótipo de buva resistente ao herbicida 2,4-D, não sendo observada resistência cruzada para os herbicidas auxínicos neste biótipo.

Em ambos os experimentos as estratégias de manejo adotadas foram essenciais no controle das plantas de buva. A aplicação dos herbicidas em associação com o herbicida saflufenacil aumentou a eficiência e velocidade de controle, apresentando excelentes resultados 48 horas após primeira aplicação. O sequencial com o herbicida glufosinato de amônio, quando comparado aos herbicidas de forma isolada e na associação com o glifosato, se mostrou uma opção viável, por proporcionar controle superior e maior velocidade inicial de controle.

O estágio de desenvolvimento é um fator essencial para o controle das plantas de buva, onde estádios mais avançados são altamente dependentes de associações triplas ou de sequenciais para um controle eficaz.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ADEGAS FS, VARGAS L, GAZZIEIRO DLP, KARAM D. Impacto econômico da resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil. Londrina: **Embrapa Soja**, 2017; 11.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 190, de 30 de Novembro de 2017. Disponível em:<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2871639/RDC_190_2017_.pdf/eb2f6c7f-c965-4e76-bed9-ea9842e48b5c> Acessado em: 27 de junho.

ASHIGH, J.; HALL, J. C. Bases for interactions between saflufenacil and glyphosate in plants. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7335-43, 2010.

BAJWA, A. A.; SADIA, S.; ALI, H. H.; JABRAN, K.; PEERZADA, A. M.; CHAUHAN, B. S. Biology and management of two important Conyza weeds: a global review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 24, p. 24694-710, 2016.

CASTRO EB, CARBONARI CA, VELINI ED, BEN R, BELAPART D, GOMES GLGC, et al. Deposição da calda e eficácia de controle de glyphosate e saflufenacil associados a adjuvantes. **Revista Brasileira de Herbicida**, v. 16, n. 2, p. 103-111, 2017.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; FIGUEIREDO, M. R. A.; PERES, L. E. P.; NISSEN. S. J.; GAINES, T, A. Auxinic herbicides, mechanisms of action, and weed resistance: A look into recent plant science advances. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 4, p. 356-62, 2015.

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

CONWAY, T. J.; MCCABE, P. F. Plant Programmed Cell Death (PCD): Using Cell Morphology as a Tool to Investigate Plant PCD. In *Advances in Plant Ecophysiology Techniques*. Springer, Cham, p. 273-281, 2018.

DAUPHINEE, A. N.; WARNER, T. S.; GUNAWARDENA, A. H. A comparison of induced and developmental cell death morphologies in lace plant (*Aponogeton madagascariensis*) leaves. *BMC plant biology*, v.14, n. 1, p. 389, 2014.

DEVINE, M. D.; DUKE, S. O.; FEDTKE, C. *Physiology of herbicide action*; PTR Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ, 1993.

DICKMAN, M.; WILLIAMS, B.; LI, Y.; FIGUEIREDO, P.; WOLPERT, T. Reassessing apoptosis in plants. **Nature Plants**, v. 3, n. 10, p. 773–779, 2017.

EPP JB, ALEXANDER AL, BALKO TW, BUYSSE AM, BREWSTER WK, BRYAN K, et al. The discovery of Arylex™ active and Rinskor™ active: Two novel auxin herbicides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 362-71, 2016.

FRANS, R.; TALBERT, R.; MARX, D.; CROWLEY, H. *Experimental Design and Techniques for Measuring and Analyzing Plant Responses to Weed Control Practices*. 3th. ed. Las Cruces, Weed Science Society of America, 1986.

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

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

GHANIZADEH, H.; HARRINGTON, K. C. Cross-resistance to auxinic herbicides in dicamba-resistant *Chenopodium album*. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, n.60, v. 1, p. 45–53, 2016.

GLEASON, C.; FOLEY, R. C.; SINGH, K. B. Mutant analysis in *Arabidopsis* provides insight into the molecular mode of action of the auxinic herbicide dicamba. **PLoS one**, v. 6, n. 3, p. e17245, 2011.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 1, p.37–43, 2007.

GROSSMANN K, HUTZLER J, CASPAR G, KWIATKOWSKI J, BROMMER CL. Saflufenacil (Kixor™): biokinetic properties and mechanism of selectivity of a new protoporphyrinogen IX oxidase inhibiting herbicide. **Weed Science**; v. 59, n. 3, p. 290-98, 2011.

GROSSMANN K. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. **Pest Management Science**, v. 66, n. 2, p.113-20, 2009.

GUNAWARDENA AHLAN: Programmed cell death and tissue remodelling in plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 59, p. 445-51, 2008.

HARRE NT, NIE H, ROBERTSON RR, JOHNSON WG, WELLER SC AND YOUNG BG, Distribution of herbicide-resistant giant ragweed (*Ambrosia trifida*) in Indiana and characterization of distinct glyphosate-resistant biotypes. *Weed Sci* 65:699–709 (2017).

HEAP, I. Resistance to auxin-type herbicides in wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) populations in western Canada. In: **Weed Sci. Soc. Am. Abstr.** 1992. p. 164.

HEAP, I. The International Herbicide-Resistant Weed Database. Online. Saturday, June 11, 2022 . Available online at: www.weedscience.org.

IPEA – INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA. Balança comercial do agronegócio brasileiro apresenta superávit de US\$ 105,1 bilhões em 2021. Brasil, 2002.

JACOBS, J. M.; JACOBS, N. J.; SHERMAN, T. D.; DUKE, S. O. Effect of diphenyl ether herbicides on oxidation of protoporphyrinogen to protoporphyrin in organellar and plasma membrane enriched fractions of barley. **Plant Physiology**, n. 97, p. 197-203, 1991.

JÚNIOR, N. S. V.; JAKELAITIS, A.; CARDOSO, I. S.; REZENDE, P. N.; MORAES, N. C.; ARAÚJO, V. T.; TAVRES, C. J. Associação de herbicidas aplicados em pós-emergência na cultura do milho. **Global Science and Technology**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2015.

KRANNER, I.; MINIBAYEVA, F. V.; BECKETT, R. P.; SEAL, C. E. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, v. 188, n. 3, p. 655-673, 2010.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; HENGARTNER, M. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell death and differentiation**, v. 16, n.1, p. 3, 2009.

KUMAR, V.; CURRIE, R. S.; JHA, P.; STAHLMAN, P. W. First Report of Kochia (*Bassia scoparia*) with Cross-Resistance to Dicamba and Fluroxypyr in Western Kansas. **Weed Technology**, v. 33, n. 2, p. 335-41, 2019.

LECLERE, S.; WU, C.; WESTRA, P.; SAMMONS, R. D. Cross-resistance to dicamba, 2,4-D, and fluroxypyr in *Kochia scoparia* is endowed by a mutation in an AUX/IAA gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 13, p. 2911–2920, 2018.

LESPÉRANCE, M. A. Programmed cell death and altered translocation cause glyphosate resistance in giant ragweed (*Ambrosia Trifida* L.). Master of Science, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, (2016).

LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; DIXON, R.; LAMB, C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v. 79, n. 4, p. 583-593, 1994.

LOCATO, V.; DE GARA, L. Programmed Cell Death in Plants: An Overview. **Plant Programmed Cell Death**, p. 1–8, 2018.

MAGHSOUDI, N.; ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R. A. Programmed cell death and apoptosis—where it came from and where it is going: from Elie Metchnikoff to the control of caspases. **Exp. Oncology**. v. 34, p.146–152, 2012.

MCCABE, P. F.; LEVINE, A.; MEIJER, P. J.; TAPON, N. A.; PENNELL, R. I. A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density. **The Plant Journal**, v. 12, n.2, p. 267-280, 1997.

MININA, E. A.; FILONOVA, L. H.; DANIEL, G.; BOZHKO, P. V. Detection and measurement of necrosis in plants. In *Necrosis* (pp. 229-248). Humana Press, Totowa, NJ, 2013.

MININA, E. A.; FILONOVA, L. H.; FUKADA, K.; SAVENKOV, E. I.; GOGVADZE, V.; CLAPHAM, D.; SMERTENKO, A. Autophagy and metacaspase determine the mode of cell death in plants. **Journal of Cell Biology**, v. 203, n. 6, p. 917-927, 2013.

MONQUERO, P. A.; CURY, J. C.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n.3, p.445-451, 2004

MOREIRA, M. S.; MELO, M. S. C.; CARVALHO, S. J. P.; NICOLAI, M.; CRHISTOFFOLETI, P. J. Herbicidas alternativos para controle de biótipos de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* resistentes ao glyphosate. **Planta Daninha**, v. 28, n. 1, p.167-75, 2010.

MORETTI, M. L.; VAN HORN, C. R.; ROBERTSON, R.; SEGOBYE, K.; WELLER, S. C.; YOUNG, B. G.; SCHULZ, B. Glyphosate resistance in *Ambrosia trifida*: Part 2. Rapid response physiology and non-target-site resistance. **Pest Management Science**, v. 74, n. 5, p. 1079–1088, 2017.

MURPHY, C. E.; LEMERLE, D. Continuous cropping systems and weed selection. *Euphytica*. 2006; v. 148, n. (1-2), p. 61-73, 2006.

OWEN, M. D.; ZELAYA, I. A. Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. **Pest Management Science**, v. 61, n. 3, p. 301-11, 2005.

PETERSON, M. A.; COLLAVO, A.; OVEJERO, R.; SHIVRAIN, V.; WALSH, M. J. The challenge of herbicide resistance around the world: a current summary. **Pest Management Science**, v. 74, n. 10, p. 2246-2259, 2018.

PINHO, C. F.; LEAL, J. F. L.; SOUZA, A. S.; OLIVEIRA, G. F. P. B.; OLIVEIRA, C.; LANGARO, A. C.; 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, n. 10, p. 1688, 2019.

QUEIROZ, A. R.; DELATORRE, C. A.; LUCIO, F. R.; ROSSI, C. V.; ZOBIOLE, L. H.; MEROTTO, A. Rapid necrosis: a novel plant resistance mechanism to 2, 4-D. **Weed Science**, n. 68, v. 1, p. 6-18, 2020.

REAPE, T. J.; MCCABE, P. F. Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants. *Apoptosis*, v. 15, n. 3, p. 249-256, 2010.

REAPE, T. J.; MOLONY, E. M.; MCCABE, P. F. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 3, p. 435–444, 2008.

SANTOS, F. M.; VARGAS, L.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; AGOSTINETTO, D.; MARTIN, T. N.; RUCHEL, Q. et al. Estádio de desenvolvimento e superfície foliar reduzem a eficiência de chlorimuron-ethyl e glyphosate em *Conyza sumatrensis*. **Planta daninha**, v. 32, n. 2, p. 361-75, 2014.

SCOTT, I.; LOGAN, D. C. Mitochondrial morphology transition is an early indicator of subsequent cell death in *Arabidopsis*. **New Phytologist**, v. 177, n. 1, p. 90-101, 2008.

SPAUNHORST, D. J.; BRADLEY KW. Influence of dicamba and dicamba plus glyphosate combinations on the control of glyphosate-resistant waterhemp (*Amaranthus rudis*). **Weed Technology**, v. 27, n. 4, p. 675-81, 2013.

SPERRY, B.; FERRELL, J.; SMITH, H.; FERNANDEZ, V.; LEON, R.; SMITH, C. Effect of Sequential Applications of Protoporphyrinogen Oxidase-Inhibiting Herbicides on Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*) Control and Peanut Response. **Weed Technology**, v. 31, n. 1, p. 46-52, 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 888 p., 2017.

TAKANO, H. K.; OLIVEIRA, J. R. R. S.; CONSTANTIN, J.; BIFFE, D. F.; FRANCHINI, L. H. M.; BRAZ, G. B. P.; RIOS, F. A.; GHENO, E. A.; GEMELLI, A. Efeito da adição do 2,4-D ao glyphosate para o controle de espécies de plantas daninhas de difícil controle. **Revista Brasileira de Herbicida**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2013.

VAN DOORN, W. G.; BEERS, E. P.; DANGL, J. L.; FRANKLIN-TONG, V. E.; GALLOIS, P. et al. Morphological classification of plant cell deaths. **Cell Death Differ.** v. 18, p. 1241–46, 2011.

VAN DOORN WG. 2011. Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 4749–61, 2011.

VAN DOORN, W. G. V.; PAPINI, A. Ultrastructure of autophagy in plant cells. **Autophagy**, v. 9, n. 12, p. 1922-1936, 2013.

VAN DURME, M.; NOWACK, M. K. Mechanisms of developmentally controlled cell death in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 29, p. 29-37, 2016.

VAN HAUTEGEM, T.; WATERS, A. J.; GOODRICH, J.; NOWACK, M. K. Only in dying, life: programmed cell death during plant development. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 2, p. 102–113, 2015.

VAN HORN C. R.; MORETTI, M. L.; ROBERTSON, R. R.; SEGOBYE, K.; WELLER, S. C.; YOUNG, B. G ET al. Glyphosate resistance in *Ambrosia trifida*: I. Novel rapid cell death response to glyphosate. **Pest Management Science**, v. 74, p. 1071–1078, 2018.

VAN HORN, C. R.; MORETTI, M. L.; ROBERTSON, R. R.; SEGOBYE, K.; WELLER, S. C.; YOUNG, B. G.; GAINES, T. A. Glyphosate resistance in *Ambrosia trifida*: Part Novel rapid cell death response to glyphosate. *Pest Management necrosis in plants*. In *Necrosis* (pp. 229-248). Humana Press, Totowa, NJ, 2017.

VARGAS, L.; GAZZIERO, D.; AGOSTINETTO, D.; KARAM, D.; ADEGAS, F. Manejo de resistência em sistemas de cultivo soja/milho, 2013.

WALSH, T. A.; NEAL, R.; MERLO, A. O.; HONMA, M.; HICKS, G. R.; WOLFF, K.; ET AL. Mutations in an auxin receptor homolog AFB5 and in SGT1b confer resistance to synthetic picolinate auxins and not to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid or indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 142, n. 2, p. 542– 52, 2006.

WEBSTER, T. M.; VENCILL W. K.; SAMMONS R. D.; JIANG J.; PRESTON C.; LEACH J. E.; WESTRA P. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 107, v. 3, p.1029-1034, 2010.

WERTH, J.; WALKER, S.; BOUCHER, L.; ROBINSON, G. Applying the double knock technique to control *Conyza bonariensis*. **Weed Biology Management**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2010.

ZHIVOTOSKY, B.; ORRENIUS, S. Assessment of Apoptosis and Necrosis by DNA Fragmentation and Morphological Criteria. *Current Protocols in Cell Biology*, 2001.

ZOBIOLE, L. H. S.; KRENCHINSKI, F. H.; PEREIRA, G. R.; RAMPAZZO, P.; RUBIN, R. S.; LUCIO, F. R. Management programs to control *Conyza* spp. in Pre-Soybean Sowing Applications. **Planta Daninha**, v. 36, p. e018175883, 2018.

6 CAPÍTULO IV

ABSORÇÃO E TRANSLOCAÇÃO DO HERBICIDA ¹⁴C-GLIFOSATO E ¹⁴C-SAFLUFENACIL EM *Conyza sumatrensis* RESISTENTE

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar os padrões de absorção e translocação dos herbicidas glifosato e saflufenacil em biótipos resistentes e suscetíveis de *Conyza sumatrensis*. O primeiro ensaio foi realizado no Laboratório de Ecotoxicologia, CENA / USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil. O herbicida formulado com saflufenacil foi aplicado a 70 g de equivalente ácido (a.e.) ha⁻¹ usando um pulverizador de via aérea com bico único calibrado para fornecer 150 L ha⁻¹. A folha mais expandida foi tratada com 2,14 kBq com 99% de pureza. As coletas foram realizadas às 12, 24, 48, 72 e 96 horas após o tratamento (HAT) e divididas nas quatro partes: folhas tratadas, folhas acima das folhas tratadas, folhas abaixo das folhas e raiz. As partes das plantas previamente divididas foram secas em estufa a 50°C por 48 h e queimadas em um oxidante biológico. O segundo ensaio foi realizado na Colorado State University (CSU, EUA). O herbicida formulado foi aplicado na dose de 720 g ia ha⁻¹ em câmara de aplicação. A folha mais expandida, foi tratada com 3.84 kBq com 96% de pureza. As coletas foram realizadas as 24, 48, 72, 96 e 120 HAT e divididas em três partes: folha tratada, outras folhas e raiz. As partes das plantas previamente divididas foram secas em estufa a 50°C por 48 h e queimadas em um oxidante biológico. Diferenças estatísticas não foram observadas quanto a absorção e translocação do ¹⁴C-glifosato e ¹⁴C-saflufenacil entre os biótipos resistentes e suscetíveis. A redução da absorção e/ou translocação não pode ser considerada o mecanismo de resistência para o biótipo resistente de *Conyza sumatrensis*.

Palavras-chave: resistência múltipla, absorção de herbicidas, NTRS, herbicida radiomarcado

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the absorption and translocation patterns of glyphosate and saflufenacil in resistant and susceptible populations of *Conyza sumatrensis*. The first trial was carried out at the Ecotoxicology Laboratory, CENA / USP, Piracicaba, São Paulo, Brazil. The saflufenacil-formulated herbicide was applied to 70 g of acid equivalent (a.e.) ha⁻¹ using a single-spray nozzle calibrated to deliver 150 L ha⁻¹. Expanded leave was treated with 2.14 kBq using saflufenacil radiolabeled with 99% pure. The plants were harvested at 12, 24, 48, 72, and 96 hours after treatment (HAT) and divided in four parts: treated leaf, leaves under and above treated leaf and root. For better visualization of the final position of the radiolabeled herbicide, the treated plants were oxidized in a biological oxidizer. The second trial was carried out at Radiation Laboratory in Colorado State University. The glyphosate-formulated herbicide was applied to 720 g of acid equivalent (a.e.) ha⁻¹ using spray chamber. Each plant was treated with 3.84 kBq using glyphosate radiolabeled with 96% pure. The plants were harvested at 24, 48, 72, 96 and 120 hours after treatment (HAT) and divided in three parts: treated leaf, other leaves and root. For better visualization of the final position of the radiolabeled herbicide, the treated plants were oxidized in a biological oxidizer. There was no difference in the absorption and translocation of the herbicide saflufenacil and glyphosate in susceptible and resistant biotypes.

Keywords: resistance to herbicides, multiple resistance, herbicide uptake, NTRS, radiolabeled herbicide

6.1 INTRODUÇÃO

A *Conyza sumatrensis* é uma das plantas daninhas mais danosas na agricultura por causar as culturas extensas perdas de rendimento; estas perdas podem ser ainda maiores quando os biótipos apresentam resistência múltipla a herbicidas. Atualmente para a espécie *Conyza sumatrensis*, existem 20 casos de biótipos resistentes; ocorrendo no ano de 2017, no Brasil, o relato de resistência múltipla aos herbicidas glifosato, diuron, paraquat, saflufenacil e 2,4-D (HEAP, 2022). Com a evolução da resistência múltipla, a utilização de herbicidas para controle das plantas daninhas torna-se um desafio. Além disso, as características biológicas da *Conyza sumatrensis*, como elevada capacidade de produção e dispersão de sementes, aptidão para sobreviver em condições distintas e fluxo de emergência durante diferentes períodos do ano, confere a esta planta daninha, ampla adaptação ecológica, rápida disseminação e difícil controle (BHOWMIK & BEKECH, 1993; WEAVER et al., 2001).

O nível de resistência das plantas daninhas aos herbicidas pode ser classificados em dois mecanismos diferentes, conhecidos como resistência ao local alvo (TSR) e resistência ao local não alvo (NTR). O mecanismo TSR envolve mudanças na enzima do local alvo ou sem sua atividade (POWLES & YU, 2010). Os mecanismos NTRs estão relacionadas as modificações nas características das plantas que incluem a penetração e absorção reduzidas; translocação alterada (SAMMONS & GAINES, 2014); rápida necrose (NANDULA et al., 2014) e sequestro do herbicida no vacúolo (GE et al., 2010).

Para gênero *Conyza* diversos mecanismos de resistência foram relatados ao herbicida glifosato, sendo o mais comum a translocação reduzida, geralmente atribuída ao rápido aprisionamento do herbicida no vacúolo (SHANER, 2009; GE et al., 2010). Esse transporte do herbicida glifosato para o vacúolo está associado a transportadores ativos de tonoplastos da superfamília de transportadores ABC (YUAN et al., 2010). Estudos anteriores demonstraram que por meio da pirosequenciação GS-FLX 454, uma expressão aumentada de vários genes transportadores ABC foi encontrada em *Conyza canadensis* resistentes após aplicação do herbicida glifosato (PENG et al., 2010). Redução da translocação foi observado em biótipos resistentes de *Conyza canadensis*, os resultados sugeriram que a resistência é devido à alteração na distribuição celular, que reduziu o translocamento no floema e a importação plastídica do glifosato (FENG et al., 2004).

O glifosato é um herbicida pós-emergente, não seletivo, de amplo espectro de plantas daninhas (DILL et al., 2010). O herbicida atua competindo com o fosfoenolpiruvato se ligando irreversivelmente a 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) inibindo a função normal na via do shiquimato (ALARCON-REVERTE et al., 2013). A inibição da enzima EPSPs resulta em fluxo de carbono desregulado por meio da produção excessiva de shiquimato-3-fosfato e síntese insuficiente dos aminoácidos fenilalanina, triptofano e tirosina necessários para a síntese de proteínas, resultando na morte das plantas (DUKE & POWLES 2008).

Para o herbicida saflufenacil este é o primeiro caso relatado para a espécie *Conyza sumatrensis*. O mecanismo de resistência para herbicidas inibidores da Prottox está frequentemente relacionado ao local alvo; como elucidado para espécie *Amaranthus tabernáculos* com deleção da glicina na posição 210 na isoforma mitocondrial da enzima (PATZOLDT et al., 2006) e a superexpressão dos genes que codificam a enzima Prottox (JUNG & KUK, 2007). Os mecanismos não relacionados ao local alvo, geralmente estão associadas a rápida metabolização do herbicida como observado em *Ipomeia lacunosa*, com habilidade de metabolizar rapidamente o herbicida sulfentrazone (THOMAS et al., 2005). Também foi observado alto nível de enzimas antioxidantes, na espécie *Euphorbia heterophylla*, onde as

atividades constitutivas e induzidas das enzimas SOD e POD contribuíram para resistência da espécie aos inibidores da Protox (XAVIER et al., 2018).

Os herbicidas inibidores da Protox, agem inibindo a Protox, gerando um descontrolado acúmulo de protoporfirinogênio IX, que é extravasado para fora dos cloroplastos, onde é convertido em Proto que reage com a luz gerando oxigênio singlete reativo que induz a peroxidação lipídica da membrana plasmática (LEHNEN et al., 1990; DAYAN & DUKE, 2010). Para os herbicidas inibidores da Protox já foram relatados 35 casos de resistência em diferentes espécies de plantas daninhas (HEAP, 2020). Porém a redução da absorção e translocação diferencial dos herbicidas inibidores da Protox, como mecanismo de resistência, ainda não foi completamente elucidado.

A elucidação do mecanismo de resistência a herbicidas é fundamental na previsão da trajetória evolutiva da resistência, sendo assim o objetivo deste trabalho foi investigar a absorção e translocação diferencial do herbicida glifosato e saflufenacil em biótipos resistente e suscetível de *Conyza sumatrensis*.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Material Vegetal

Biótipos de *Conyza* spp. originados de falhas no controle de plantas daninhas foram coletadas do campo com histórico de aplicação de herbicida, incluindo várias aplicações de glifosato, 2,4-D, paraquat e saflufenacil para confirmar a resistência ao paraquat. As plantas sobreviventes foram autopolinizadas e as sementes F1 de *Conyza sumatrensis* das plantas foram identificadas como resistentes ao paraquat e ao saflufenacil (Heap, 2019). Essas plantas foram selecionadas e cultivadas em casa de vegetação para a produção das sementes da geração F2, com o objetivo de concluir um ensaio de dose-resposta com herbicidas que incluísse diferentes modos de ação. O local de coleta original estava em Assis Chateaubriand-Paraná, Brasil (24 ° 16'53,8 "S 53 ° 30'47,5" W). Outra população suspeita de ser suscetível a todos os modos de ação foi coletada. As sementes foram semeadas em vasos de 2,5 dm³ preenchidos com substrato, após a emergência foram colocadas para uma planta por vaso. As plantas foram cultivadas até o estágio reprodutivo, devidamente identificado como *Conyza sumatrensis* no Herbário da Universidade Estadual do Paraná (UPCB) e no Instituto de Biologia - Herbário Uberlandense da Universidade Federal de Uberlândia (PINHO et al., 2019).

Com base nos resultados obtidos por Pinho et al., 2019, foi confirmada a resistência múltipla de *Conyza sumatrensis* a cinco modos de ação a herbicidas como paraquat, saflufenacil, diuron, 2,4-D e glifosato no Paraná-Brasil. Este é o primeiro relato de *Conyza sumatrensis* resistente ao diuron e 2,4-D e o primeiro caso de *Conyza sumatrensis* com resistência múltipla a cinco mecanismo de ação diferente no mundo.

Para explorar o envolvimento dos mecanismos de resistência non target site, as plantas foram avaliadas quanto à absorção e translocação dos herbicidas glifosato e saflufenacil radiomarcado.

6.2.2 ¹⁴C-saflufenacil absorção e translocação

Biótipos suscetíveis e resistentes de *Conyza sumatrensis* foram cultivados em casa de vegetação localizada na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ. A irrigação ocorria diariamente. As sementes das plantas foram germinadas em bandejas plásticas de 200 células preenchidas com substrato comercial. Quando biótipos suscetíveis e resistentes atingiram o estágio fenológico de duas folhas, foram transplantados em vasos de 0,35 L preenchidos com substrato comercial. Após transportadas para o laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA / USP), em Piracicaba-SP.

O experimento foi realizado no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA / USP), em Piracicaba-SP. Os biótipos suscetível e resistente foram avaliados quanto a absorção e translocação. Inicialmente, a folha mais expandida foi coberta com papel alumínio para evitar a solução de pulverização da aplicação aérea. O herbicida formulado foi aplicado a 70 g i. a ha⁻¹ usando um pulverizador costal de bico único calibrado para fornecer 150 L ha⁻¹.

A solução radiomarcada foi aplicada na última folha totalmente expandida, com o auxílio de uma microseringa. O herbicida radiomarcado foi aplicado na face adaxial das folhas, concentração de 214,786 dpm/ planta e com pureza radioativa de 99%. As plantas foram transferidas para a estufa após a aplicação e a irrigação foi realizada diretamente no solo,

evitando o contato com as folhas. *Conyza sumatrensis* resistente e suscetível foram coletadas as 6, 12, 24, 48 e 72 h após o tratamento (HAT) e divididas nas seguintes quatro partes: folhas tratadas, folhas acima das folhas tratadas, folhas abaixo das folhas e raízes tratadas.

As folhas tratadas foram lavadas com uma solução contendo 1 mL de metanol e 1 mL de água deionizada para lavar o material radioativo não absorvido. Foi adicionado fluido de cintilação e a radioatividade recuperada na lavagem das folhas foi determinada em espectrometria de cintilação líquida (Packard 1900 TR). A radioatividade presente no líquido das folhas lavadas e nos tecidos das plantas foi determinada para verificar se a soma estava próxima do total aplicado. Partes das plantas foram previamente dividida e colocadas em estufa a 50°C por 48h e oxidada no oxidador biológico (OX 600 Harvey Instruments). O herbicida absorvido foi determinado por porcentagem de radiação presente nas partes das plantas e a radiação foi quantificada por espectrômetro de cintilação líquida.

Para melhor visualização da posição final do herbicida radiomarcado, as plantas foram tratadas e as folhas lavadas nos mesmos intervalos de tempo, conforme descrito na seção anterior. Após a lavagem das folhas tratadas (1 ml de metanol e 1 ml de água deionizada), as plantas foram secas e prensadas e passadas em scanner (Cyclone-Packard). A proporção de [¹⁴C] saflufenacil não absorvido (RTNA) foi calculada usando a equação:

$$\%H_{nabs} = [^{14}C_{al} \times 100] / ^{14}C_{wl}$$

Onde, %H_{nabs} é a proporção de herbicida não absorvido, ¹⁴C_{al} é a quantidade de ¹⁴C medida na água de lavagem da folha tratada e ¹⁴C_{wl} é a quantidade de ¹⁴C detectado na folha tratada.

A absorção de [¹⁴C] saflufenacil foi calculada usando:

$$\%H_{abs} = [^{14}C_{ot} / (^{14}C_{ot} + ^{14}C_{wl})] \times 100$$

Onde %H_{abs} é a proporção de herbicida absorvido, ¹⁴C_{ot} é a quantidade de ¹⁴C medida do tecido oxidado e ¹⁴C_{wl} é a quantidade de ¹⁴C detectado na folha tratada.

A translocação de [¹⁴C] saflufenacil foi calculada usando:

$$\%H_{tr} = 100 - [^{14}C_{al} / (^{14}C_{tl} + ^{14}C_{ol})] \times 100$$

Onde %H_{tr} é a proporção de herbicida translocado, ¹⁴C_{tl} é a quantidade de ¹⁴C mensurado na folha tratada e ¹⁴C_{ol} é a quantidade de ¹⁴C detectado em outras folhas.

6.2.3 ¹⁴C-glifosato absorção e translocação

O experimento foi realizado no Radiation Laboratory Colorado State University (EUA) de acordo com a metodologia proposta por Figueiredo et al., 2017. Plantas com quatro a cinco folhas verdadeiras foram transferidas para tubos falcon de 50 mL preenchidos com areia de sílica fina não lavada. As plantas foram irrigadas diariamente e o fertilizante foi adicionado um dia após o transplante (solução Miracle-Gro a 0,05%; Scotts Miracle-Gro Company, Marysville, OH, EUA).

As plantas foram movidas para câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 h, 25 °C, 70% de umidade relativa e luz 500 mmol m⁻² s⁻¹. A segunda folha totalmente expandida de cada planta foi tratada com [¹⁴C] glifosato associado com glifosato formulado e 0,25% de tensoativo não iônico (NIS) (Alquilpolioxi-etileno; Alligare, Opelika, AL, EUA). Cada planta foi tratada com seis gotículas de 1μL (10 mg glifosato cm⁻²). A radioatividade total por planta foi de 200.000 dpm (3,84 KBq). Quatro plantas de cada biótipo foram colhidas aleatoriamente às 12,

24, 48, 96 e 120 horas após o tratamento (HAT). A folha tratada de cada planta foi cortada e lavada com 5 ml de solução de lavagem (89:10:1 água:metanol:NIS). A lavagem das folhas foi misturada com 10 mL de solução de cintilação (Ecoscint™ XR, National Diagnostics, Atlanta, GA, EUA). As raízes foram lavadas com 10 mL de água e 1 mL de água de enxágue foi coletado e adicionado a 10 mL de solução de cintilação. As lavagens de folhas e raízes foram medidas para radioatividade usando espectrometria de cintilação líquida (LSS) (Packard Tri-carb 2300TR, Packard Instrument Co., Meriden, CT, EUA).

As plantas secas foram separadas em folha tratada, raízes e resto das plantas e oxidadas em oxidante biológico (OX500; RJ Harvey Instrument Co., Tappan, NY, EUA). A proporção de [¹⁴C] glifosato absorvida foi calculada usando a equação:

$$\%H_{abs} = [^{14}\text{C ot} / (^{14}\text{C ot} + ^{14}\text{C wl})] \times 100$$

Onde %H_{abs} é a proporção de herbicida absorvido, ¹⁴C ot é a quantidade de ¹⁴C medida do tecido oxidado e ¹⁴C wl é a quantidade de ¹⁴C detectado na folha tratada. A translocação de [¹⁴C] glifosato foi calculada usando:

$$\%H_{tr} = 100 - [^{14}\text{C tl} / (^{14}\text{C tl} + ^{14}\text{C ol})] \times 100$$

Onde %H_{tr} é a proporção de herbicida translocado, ¹⁴C tl é a quantidade de ¹⁴C mensurado na folha tratada e ¹⁴C ol é a quantidade de ¹⁴C detectado em outras folhas.

6.2.4 Análise estatística

Os dados obtidos na avaliação da translocação na aplicação localizada do herbicida glifosato foram submetidos à análise de variância (ANOVA) (p <0,05) e as médias foram analisadas pelo teste de Tukey a 5%. A análise estatística foi realizada no software R. Os dados obtidos na absorção e translocação do ¹⁴C-saflufenacil e ¹⁴C-glifosato foram submetidos à ANOVA e a regressão.

6.3 RESULTADOS E DISSCUSSÃO

6.3.1 Avaliação da translocação do herbicida ^{14}C -saflufenacil

Os biótipos suscetíveis e resistentes sob a aplicação do herbicida saflufenacil não apresentaram diferença na absorção e translocação do produto. A absorção em ambos os biótipos foi aproximadamente 20%. Não houve ajuste da curva para o biótipo suscetível. Porém pode se observar que não houve expressiva translocação em ambos os biótipos (Figura 1 e 2). Resultados diferentes foram observados para a espécie *Solanum nigrum*, após a absorção foliar do herbicida [^{14}C], onde este foi capaz de se mover sistemicamente dentro da planta através do tecido vascular do floema até áreas de crescimento meristemático e ficando armazenado nas partes residuais da parte aérea e na raiz (GROSSMANN et al., 2011).

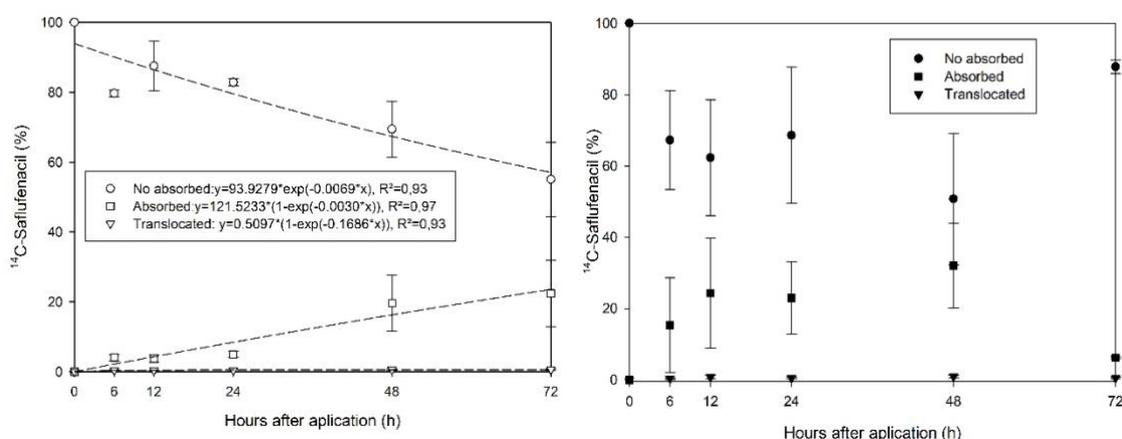


Figura 1. Avaliação da porcentagem de ^{14}C -saflufenacil absorvido, não absorvido e translocado as 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a aplicação nos biótipos resistentes (esquerda) e suscetível (direita) de *Conyza sumatrensis*. PDPA/UFRRJ, 2022.

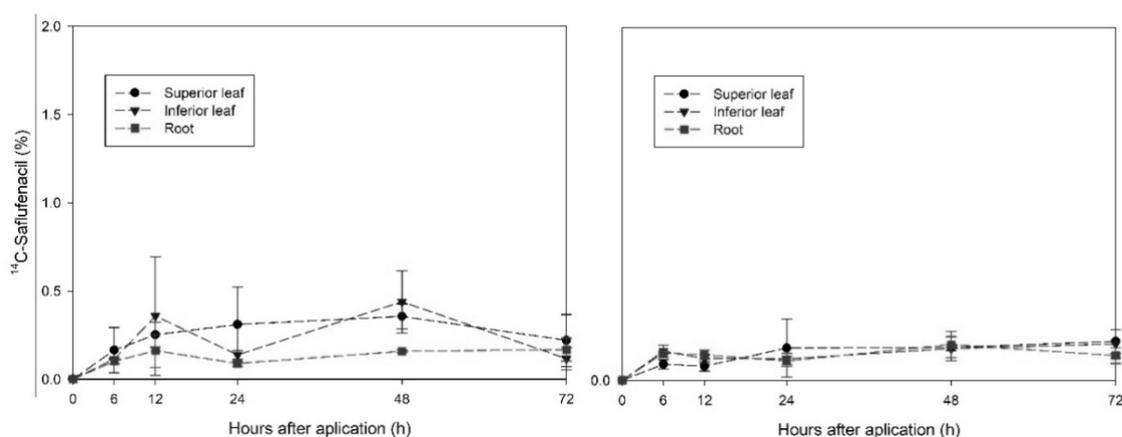


Figura 3. Avaliação quantitativa da translocação do herbicida ^{14}C -saflufenacil as 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a aplicação nos biótipos suscetíveis (esquerda) e resistente (direita) de *Conyza sumatrensis*, seccionados em folha superior, folhas inferior e raiz. PDPA/UFRRJ, 2022.

A expectativa geral é que a alta atividade inicial de um inibidor de PPO provoque dano necrótico rápido dos tecidos vasculares, o que diminui sua potencial translocação sistêmica. Porém, de acordo com o modelo de previsão de Kleier, as propriedades físicas do saflufenacil,

em termos de valor da constante de ionização em solução aquosa (logaritmo negativo da constante de dissociação ácida, [pKa] de 4,4) e coeficiente de partição octanol/água (logaritmo do coeficiente de partição octanol-água [Log Po/w] de 2,6), são quase ideais para sistemicidade do floema por meio do mecanismo de armadilha de íons (Kleier et al. 1998). Neste contexto, o sistema vascular da planta, onde os valores de pH normalmente variam de 6 no xilema a 8 no floema (Kleier et al. 1998), o saflufenacil ácido existirá como a forma aniônica no xilema e na seiva do floema. Isso permite o transporte de longa distância do herbicida dentro da planta antes que ocorra a destruição completa do tecido. (GROSMANN et al., 2011). O que justifica a avaliação quanto a absorção e translocação deste herbicida. Porém, para a *Conyza sumatrensis* não foi observado translocação nos biótipos suscetíveis e resistentes as 6 horas (A- suscetível e B resistente) e as 72 horas (C- suscetível e D- resistente) após o tratamento nas análises qualitativas (figura 3).

6.3.2 Avaliação da translocação do herbicida ¹⁴C-glifosato

Não foi observado diferença entre os biótipos avaliados na absorção do herbicida glifosato. Ambos os biótipos absorveram aproximadamente 20% do herbicida aplicado após 24h e este permaneceu estável até 120h após aplicação. Para a translocação também não foi possível observar diferença entre os biótipos. Em ambos os biótipos é possível observar que a translocação foi aproximadamente 20% as 24h não havendo significativa alteração até a última avaliação 120h após aplicação (Figura 1).

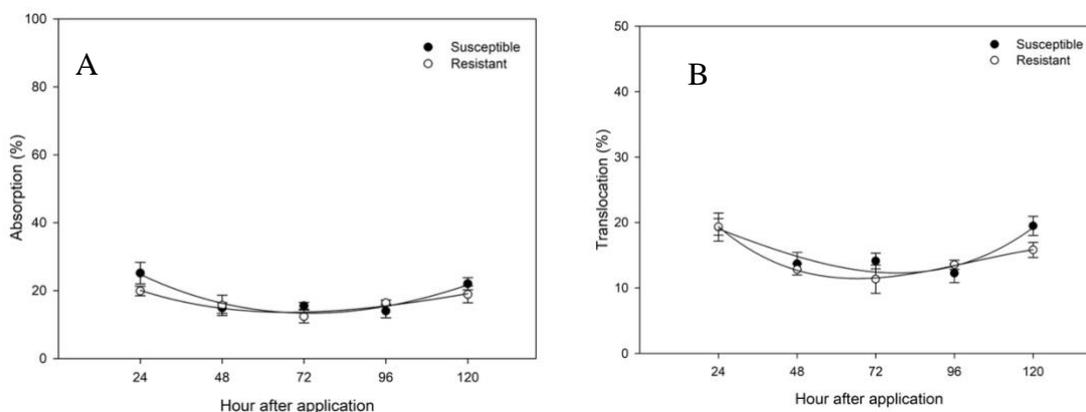


Figura 1. Avaliação da porcentagem de ¹⁴C-glifosato absorvido e translocado, as 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a aplicação em biótipos suscetíveis e resistente de *Conyza sumatrensis*. PDPA/UFRRJ, 2022.

A absorção e translocação do ¹⁴C-glifosato tem sido avaliada em diversos biótipos resistentes a este herbicida. A absorção diferencial não foi frequentemente observada como mecanismo de resistência (KOGER e REDDY, 2005; DINELLI et al., 2006, Perez-Jones et al., 2007; MORETTI et al., 2017), como também foi observado para a espécie em estudo. A absorção do glifosato é um processo que ocorre em duas etapas. A primeira envolve uma rápida penetração inicial através da cutícula, seguida por uma absorção simplástica lenta (SATICHIVI et al., 2000). Pelo floema, o glifosato é translocado para as regiões em crescimento das plantas), seguindo a rota dos fotoassimilados (HETHERINGTON et al., 1999). Em diversos estudos, o

mecanismo de resistência para o herbicida glifosato tem sido associado a redução da translocação do herbicida para o local alvo, porém para o biótipo em estudo este não deve ser considerado um dos mecanismos de resistência.

6.4 CONCLUSÕES

Não houve diferença na absorção e translocação do herbicida saflufenacil e glifosato nos biótipos suscetíveis e resistentes de *Conyza sumatrensis*. A redução da absorção e translocação dos herbicidas não é um dos mecanismos de resistência a estes herbicidas no biótipo resistente de *Conyza sumatrensis* em estudo.

6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALARCÓN-REVERTE, R.; GARCÍA, A.; URZÚA, J.; FISCHER, A. J. Resistance to glyphosate in junglerice (*Echinochloa colona*) from California. **Weed Science**, v.6, n.1, p.48-54, 2013.
- ASHIGH, J.; HALL, J. C. Bases for interactions between saflufenacil and glyphosate in plants. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7335-7343, 2010.
- BHOWMIK, P. C.; BEKECH, M. M. Horseweed (*Conyza canadensis*) seed production, emergence, and distribution in no-tillage and conventional tillage corn (*Zea mays*). **Agronomy Trends in Agriculture Science**, v.1, p. 67–7, 1993.
- DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Protoporphyrinogen Oxidase-Inhibiting Herbicides. Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology, p. 1733–1751, 2010
- DÉLYE, C.; JASIENIUK, M.; LE CORRE, V. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, v. 29, n.11, p.649-65, 2013.
- DILL, G. M.; R. DOUGLAS SAMMONS, PAUL CC FENG, FRANK KOHN, KEITH KRETZMER, AKBAR MEHRSHAIKH, MARION BLEEKE et al. "Glyphosate: discovery, development, applications, and properties." *Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management*, 1-33, 2010.
- DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, v.64, n.4, p.319-325, 2008.
- DINELLI, G.; MAROTTI, I.; BONETTI, A.; MINELLI, M.; CATIZONE, P.; BARNES, J. Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 86, n.1, pp. 30-41, 2006.
- 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.
- GROSSMANN, K.; HUTZLER, J.; CASPAR, G.; KWIATKOWSKI, J.; BROMMER, C. L. Saflufenacil (Kixor™): Biokinetic Properties and Mechanism of Selectivity of a New Protoporphyrinogen IX Oxidase Inhibiting Herbicide. **Weed Science**, v. 59, n. 3, p. 290–298, 2011.
- HEAP, I.M., 2022. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. [www. weedscience.org](http://www.weedscience.org) (Accessed 10.08.2018.).
- HETHERINGTON, P.R.; REYNOLDS, T.L.; MARSHALL, G.; KIRKWOOD, R.C. The absortion translocation and distribution of the herbicide glyphosate in maize expressing the CP-4 transgene. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n. 339, p.1567-1576, 1999.
- JUNG, H. I.; KUK YI. Resistance mechanisms in protoporphyrinogen oxidase (PPO) inhibitor-resistant transgenic rice. **Journal of Plant Biology**, v. 50, p. 586-94, 2007.

- KLEIER, D. A.; B. T. GRAYSON; F. C. HSU. The phloem mobility of pesticides. **Pesticide Outlook**, v. 9, n. 5, p. 26–30, 1998.
- KOGER, C. H.; REDDY, K. N. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). **Weed Science**, v. 53, n. 1, p. 84-89, 2005.
- KRAEHMER, H. Innovation: changing trends in herbicide discovery. **Pest Management**, v. 23, p.115-118, 2012.
- LEHNEN, L. P.; SHERMAN, T. D.; BECERRIL, J. M; AND DUKE, S. O. Tissue and cellular localization of acifluorfen-induced porphyrins in cucumber cotyledons. *Pestic. Biochem. Physiol.* v. 37, p. 239–248, 1990.
- MORETTI, M. L.; HANSON, B. D. Reduced translocation is involved in resistance to glyphosate and paraquat in *Conyza bonariensis* and *Conyza canadensis* from California. **Weed Research**, v. 57, n. 1, p. 25-34, 2017.
- NANDULA, V.K.; WRIGHT, A. A.; VAN HORN, C. R.; MOLIN, W.T.; WESTRA, P. REDDY, K. N. Glyphosate resistance in giant ragweed (*Ambrosia trifida* L.) from Mississippi is partly due to reduced translocation. **American Journal of Plant Sciences**, v.6, n.13, p. 2104, 2015.
- PATZOLDT, W. L.; HAGER, A. G.; MCCORMICK, J. S.; TRANEL, P. J. A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 12, pp. 329–334, 2006.
- PEREZ-JONES, A.; PARK, K. W.; POLGE, N.; COLQUHOUN, J.; MALLORY-SMITH, C. A. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. **Planta**, v. 226, n. 2, p. 395-404, 2007.
- POWLES, S. B.; QIN, YU. "Evolution in action: plants resistant to herbicides." **Annual review of plant biology**, v.61, p.317-347, 2010.
- SAMMONS, R. D.; TODD, A. G. "Glyphosate resistance: state of knowledge." **Pest management science**, v. 70, n. 9, p. 1367-1377, 2014.
- SATICHIVI, N. M.; WAX, L.M.; STOLLER, E.W.; BRISKIN, D. P. Absorption and translocation of glyphosate isopropylamine and trimethylsulfonium salts in *Abutilon theophrasti* and *Setaria faberi*. **Weed Science**, v. 48, n. 6, p. 675-679, 2000.
- SHANER, D. L. Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. **Weed Science**, v. 57, n. 1, p. 118-123, 2009.
- THOMAS, W. E.; TROXLER, S. C.; SMITH, W. D.; FISHER, L. R.; WILCUT, J. W. Uptake, translocation, and metabolism of sulfentrazone in peanut, prickly sida (*Sida spinosa*), and pitted morningglory (*Ipomoea lacunosa*). **Weed science**, v. 53, n. 4, p. 446-450, 2005.

WEAVER, S. E. The biology of Canadian weeds. *Conyza canadensis*. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 81, n. 4, p. 867-875, 2001.

XAVIER, E.; TREZZI, M.M.; OLIVEIRA, M.C.; VIDAL, R.A.; BRUSAMARELLO, A.P. Activity of Antioxidant Enzymes in *Euphorbia heterophylla* Biotypes and their Relation to Cross Resistance to ALS and Protox Inhibitors. **Planta Daninha**, v. 36, 2018.

YUAN, JOSHUA S., LAURA LG ABERCROMBIE, YONGWEI CAO, MATTHEW D. HALFHILL, XIN ZHOU, YANHUI PENG, JUN HU et al. "Functional genomics analysis of horseweed (*Conyza canadensis*) with special reference to the evolution of non-target-site glyphosate resistance." **Weed Science**, v. 58, n. 2, p.109-117, 2010.

FENG, P. C. 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.

\

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados mostraram que existem diferenças entre os biótipos suscetíveis e resistentes, quando aplicados os herbicidas 2,4-D. Os biótipos suscetíveis e resistentes apresentam a estrutura foliar diferente que pode estar associada a um mecanismo de resistência. O biótipo resistente de *Conyza sumatrensis* com rápida resposta fisiológica, apresenta alterações estruturais 30 minutos após a aplicação do herbicida 2,4-D, e o dano aumenta em 3 horas após a aplicação. Essas alterações são destacadas pela ruptura das células do mesofilo, impedindo que o herbicida atinja os feixes vasculares evitando a disseminação do herbicida em todo o tecido vegetal.

Nossos resultados demonstram que a translocação reduzida de 2,4-D contribui para a resistência no biótipo *C. sumatrensis*. A redução no transporte de 2,4-D e a perda do metabolismo de 2,4-D podem ser consequências da hipersensibilidade de *C. sumatrensis* resistente. A rápida resposta fisiológica que resulta na morte do tecido foliar após a exposição ao 2,4-D pode impedir a translocação para o local de ação.

Diante desse desafio, estratégias de manejo foram avaliadas e os herbicidas auxínicos, exceto 2,4-D, foram eficientes no controle do biótipo de buva no E1. A associação com saflufenacil, para todos os herbicidas avaliados, foi excelente na velocidade de controle no E1 e E2. O glufosinato de amônio em sequencial aos demais herbicidas proporcionou controle satisfatório das plantas, exceto para o tratamento glifosato+2,4-D no E2. O estágio de desenvolvimento das plantas foi determinante nos controles observados nos experimentos. A aplicação dos herbicidas em associação e sequencial se mostrou uma excelente opção de manejo para o controle de biótipos de buva resistente ao herbicida 2,4-D.

Para o herbicida glifosato e saflufenacil não houve diferença na absorção e translocação nos biótipos suscetíveis e resistentes de *Conyza sumatrensis*. A redução da absorção e translocação dos herbicidas não é um dos mecanismos de resistência a estes herbicidas no biótipo resistente de *Conyza sumatrensis* em estudo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBIERO, A. L. M.; PAOLI, A. A. S.; SOUZA, L. A. D.; MOURÃO, K. S. M. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper crassinervium* HB & K. (*Piperaceae*). **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 2, p. 305-312, 2005.

ANASTASIU, P.; MEMEDEMİN, D. *Conyza sumatrensis*: a new alien plant in Romania. **Botanica Serbica**, v. 36, n. 1, p. 37-40, 2012.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. *Seeds: physiology of development e germination*, 2 ed. New York: Pleenum Press, 1994. 455p.

BHOWMIK, P. C.; BEKECH, M. M. Horseweed (*Conyza canadensis*) seed production, emergence, and distribution in no-tillage and conventional tillage corn (*Zea mays*). **Agronomy Trends in Agriculture Science**, v.1, p. 67-7, 1993.

BROMILOW, R. H.; CHAMBERLAIN, K.; EVANS, A. A. Physicochemical aspects of phloem translocation of herbicides. **Weed Science**, v. 38, n. 3, p. 305-314, 1990.

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

BUICK, R. D.; BUCHAN, G. D.; FIELD, R. J. The role of surface tension of spreading droplets in absorption of a herbicide formulation via leaf stomata. **Pesticide Science**, v. 38, n. 2, p. 227-235, 1993.

BUKOVAC, M.J.; PETRACEK, P. D. Characterizing pesticide and surfactant penetration with isolated plant cuticles. **Pesticide Science**, v. 37, p. 179-194, 1993.

BUKOVAC, M. J.; PETRACEK, P. D.; FADER, R. G.; MORSE, R. D. Sorption of organic compounds by plant cuticles. **Weed Science**, v. 38, p. 289-298, 1990.

CARVALHO, D. F.; SILVA, D. G.; SOUZA, A. P.; GOMES, D. P.; ROCHA, H. S. Coeficientes da equação de Angström-Prescott e sua influência na evapotranspiração de referência em Seropédica, RJ. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola**, v. 15, n. 8, p. 108-116, 2011.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. Fundação Cargill, Campinas, 1983. 429p.

CASE, C. M.; CRAWLEY, M. J. Effect of interspecific competition and herbivory on the recruitment of an invasive alien plant: *Conyza sumatrensis*. **Biological Invasions**, v. 2, n. 2, p. 103-110, 2000.

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

CHRISTOFFOLETI, P. J.; OVEJERO, R. F. L.; J. C. CARVALHO. Aspectos de Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas. Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas Daninhas - HRAC-BR, Campinas, BR, 2004.

CRAFTS, A. S.; YAMAGUCHI, S. The autoradiography of plant materials. **Agricultural Experiment Station Manual**, v. 35, n. 1, p. 143, 1964.

CRUZ-HIPOLITO, H.; ROJANO-DELGADO, A.; DOMÍNGUEZ-VALENZUELA, J. A.; HEREDIA, A.; CASTRO, M. D. L.; PRADO, R. Glyphosate tolerance by *Clitoria ternatea* and *Neonotonia wightii* plants involves differential absorption and translocation of the herbicide. **Plant and Soil**, v. 347, n. 1, p. 221-230, 2011.

DALAZEN, G.; KRUSE, D. N.; OLIVEIRA, S. L. M.; BALBINOT, A. Sinergismo na combinação de glifosato e saflufenacil para o controle de buva. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 2, p. 29-256, 2015.

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

DÉLYE, C.; JASIENIUK, M.; LE CORRE, V. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. **Trends in Genetics**, v. 29, n.11, p.649-65, 2013.

DEVINE, M. D.; DUKE, S. O.; FEDTKE, C. Physiology of herbicide action; PTR Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ, 1993.

DITOMASO, J. M. Barriers to foliar penetration and uptake of herbicides. In *Proceedings of the California Weed Science Society* v. 51, pp. 150-155, 1999.

DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, v. 64, n. 4, p. 319–325, 2008.

FUNK, V. A.; SUSANNA, A.; STUESSY, T. F.; ROBINSON, H. Classification of Compositae. In: Funk, V. A.; Susanna, A. Stuessy, T. F. Bayer, R. J. eds. Systematics, Evolution, e Biogeography of Compositae. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy, p.171-189, 2009.

GAINES, T.A.; ZHANG, W.; WANG, D.; BUKUN, B.; CHISHOLM, S.T.; SHANER, D.L.; NISSEN, S.J.; PATZOLDT, W.L.; TRANEL, P.J.; CULPEPPER, A.S. Gene amplification confers glyphosate resistance in *amaranthus palmeri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 107, p.1029–1034, 2010.

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

GE, X.; D'AVIGNON, D. A.; ACKERMAN, J. J. H.; 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, p. 1215–1221, 2011.

GIANELLI, V.; BEDMAR, F.; ULZURRUN, P. D. D.; PANAGGIO, H. Dinámica de emergencia y competencia intraespecífica en *Conyza sumatrensis*. **Agrociencia (Uruguay)**, v. 21, n. 1, p. 69-77, 2017.

GONZÁLEZ-TORRALVA, F.; GIL-HUMANES, J.; BARRO, F.; BRANTS, I.; DE PRADO, R. Target site mutation and reduced translocation are present in a glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* Lam. biotype from Spain. **Plant physiology and biochemistry**, v.58, p. 16-22, 2012.

GRAVINA, F.; DOBRZANSKI, T.; OLCZHANESKI, L. R.; GALVÃO, C. W.; RECHE, P. M.; PILEGGI, S. A.; PILEGGI, M. Metabolic interference of sod gene mutations on catalase activity in *Escherichia coli* exposed to the herbicide Gramoxone® (paraquat). **Ecotoxicology and environmental**, v. 139, p. 89-96, 2017.

HAO, J. H.; Qiang, S.; LIU, Q. Q.; Cao, F. Reproductive traits associated with invasiveness in *Conyza sumatrensis*. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 47, n. 3, p. 245-254, 2009.

HARA-NISHIMURA, I.; HATSUGAI, N.; NAKAUNE, S.; KUROYANAGI, M.; NISHIMURA, M. Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. **Current opinion in plant biology**, v. 8, n. 4, p. 404-408, 2005.

HARPER, J.L. *The Population Biology of Plants*. Academic Press, London, UK, 1977.

HARR, J.; R. GUGGENHEIM, eds. *The Leaf Surface of Major Crops*. Friedrich Reinhardt Verlag, Berlin, 98 pp. 1995.

HEAP, I. M. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. [www. weedscience.org](http://www.weedscience.org), 2022. (Accessed 10.08.2022.).

HESS, F. D. Herbicide absorption and translocation and their relationship to plant tolerances and susceptibility. **Weed physiology**. CRC Press, p. 191-214, 2018.

HESS, F.D.; R.H. FALK. Herbicide deposition on leaf surfaces. **Weed Science**, v. 38, p. 280-288, 1990.

INACIO, E. M.; MONQUERO, P. A. Controle químico e caracterização da superfície foliar de *Conyza bonariensis* e *C. canadensis* (Asteraceae). **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 12, n. 3, p. 220-231, 2013.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2021. Produção agrícola. 2021. Instituto de Pesquisa Econômica aplicada, 2022. Comércio Exterior do Agronegócio: primeiro semestre 2022.

JUGULAM, M.; DIMEO, N.; VELDHUIS, L. J.; WALSH, M.; HALL, J. C. Investigation of MCPA (4-Chloro-2-ethylphenoxyacetate) Resistance in Wild Radish (*Raphanus raphanistrum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 51, p. 12516–12521, 2013.

KABBAGE, M.; KESSENS, R.; BARTHOLOMAY, L. C.; WILLIAMS, B. The life and death of a plant cell. **Annual Review of Plant Biology**, v. 68, p. 375–404, 2017.

- KERBAUY, G. B. *Fisiologia vegetal*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- KING, M. G.; RADOSEVICH, S. R. Tanoak (*Lithocarpus densiflorus*) leaf surface characteristics and absorption of triclopyr. **Weed Science**, v. 27, n. 6, p. 599-604, 1979.
- KIRKWOOD, R. C. (1999). Recent developments in our understanding of the plant cuticle as a barrier to the foliar uptake of pesticides. *Pesticide Science*, 55(1), 69-77.
- KIRKWOOD, R. C. 1993. Use and mode of action of adjuvants for herbicides: A review of some current work. *Pesticide Sci.* 38:93-102, 1993.
- KISSMANN, K. G.; GROTH, D. Plantas infestantes e nocivas. 2ª edição, v. II. São Paulo: BASF, 978p, 1999.
- KRAEHMER, H. Innovation: changing trends in herbicide discovery. **Pest Management Science**, v. 23, p. 115-118, 2012.
- LARRAN, A.S.; PALMIERI, V.E.; PEROTTI, V.E.; LIEBER, L.; TUESCA, D.; PERMINGEAT, H.R. Target-site resistance to acetolactate synthase (ALS)-inhibiting herbicides in *Amaranthus palmeri* from Argentina. **Pest Management Science**, n. 73, p. 2578–2584, 2017.
- LAZAROTO, C. A.; FLECK, N. G.; VIDAL, R. A. Biologia e ecofisiologia de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*). **Ciência Rural**, v. 38, p. 852-860, 2008.
- LESPÉRANCE, M.A. Programmed Cell Death and Altered Translocation Cause Glyphosate Resistance in Giant Ragweed (*Ambrosia trifida* L.); University of Guelph: Guelph, ON, Canada, 2016.
- LOCATO, V.; DE GARA, L. Programmed Cell Death in Plants: An Overview. **Plant Programmed Cell Death**, p. 1–8, 2018.
- MACHADO, A. F. L.; FERREIRA, L. R.; SANTOS, L. D. T.; SANTOS, J. B.; FERREIRA, F. A.; VIANA, R. G. Absorção, translocação e exsudação radicular de glyphosate em clones de eucalipto: clones. **Planta Daninha**, v. 27, p. 549-554, 2009.
- ROMERO-PUERTAS, M. C.; MCCARTHY, I.; GÓMEZ, M.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; DEL RIO, L. A.; PALMA, J. M. Reactive oxygen species-mediated enzymatic systems involved in the oxidative action of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. **Plant, Cell & Environment**, v. 27, n. 9, p. 1135-1148, 2004.
- MITHILA, J.; HALL, J. C.; JOHNSON, W. G.; KELLEY, K. B.; RIECHERS, D. E. Evolution of Resistance to Auxinic Herbicides: Historical Perspectives, Mechanisms of Resistance, and Implications for Broadleaf Weed Management in Agronomic Crops. **Weed Science**, v. 59, p. 445–457, 2011.
- MOREIRA, M. S.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S. J. P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Resistência de *C. canadensis* e *C bonariensis* ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 25, p.157-164, 2007.

MORETTI, M. L.; HANSON, B. D.; DÉLYE, C. Reduced translocation is involved in resistance to glyphosate and paraquat in (*Conyza bonariensis*) and (*Conyza canadensis*) from California. *Weed Research*, 2016.

NEUMANN, P. M. Agrochemicals: plant physiological and agricultural perspectives. In: NEUMANN, P. M. (Ed.). *Plant growth and leaf-applied chemicals*. Boca Raton: CRC Press, p. 1-13, 1988.

OPARKA, K. J.; ROBERTS, A. Plasmodesmata. A not so open-and-shut case. *Plant Physiol.*, v. 125, p. 123-126, 2001.

PANOZZO, S.; SCARABEL, L.; ROSAN, V.; SATTIN, M. A new Ala-122-Asn amino acid change confers decreased fitness to ALS-resistant *Echinochloa crus-galli*. *Front. Plant Sci.*, n.8, p.2042, 2017.

PEIRIS, H. M. P. Diversity and behaviour of the naturally regenerated vegetation in commercial tea soils under herbicide free integrated weed management. **Procedia Food Science**, v. 6, p. 314-317, 2016.

POWLES, S. B; YU Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p.317–347, 2010.

POWLES, S. B. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. **Pest Management Science**, v. 64, p. 360-365, 2008.

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: III-*Galinsoga parviflora*, *Crotalaria incana*, *Conyza bonariensis* e *Ipomoea cairica*. **Planta daninha**, v. 21, p. 1-9, 2003.

REY-CABALLERO, J.; MENÉNDEZ, J.; GINÉ-BORDONABA, J.; SALAS, M.; ALCÁNTARA, R.; TORRA, J. Unravelling the resistance mechanisms to 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) in corn poppy (*Papaver rhoeas*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 133, p. 67–72, 2016.

RIAR, D. S.; BURKE, I. C.; YENISH, J. P.; BELL, J.; GILL, K. Inheritance and physiological basis for 2, 4-D resistance in prickly lettuce (*Lactuca serriola* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 17, p. 9417-9423, 2011.

RICOTTA, J. A.; MASIUNAS, J. B. Relationship of leaf surface characteristics to acifluorfen tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) and related species. **Weed science**, v. 40, n. 3, p. 402-407, 1992.

RIEDERER, M.; J. SCHONHERR. Accumulation and transport of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid in plant cuticles: II. Permeability of the cuticular membrane. **Ecotoxicology Environmental and Safety** v. 9, p. 196-208, 1985.

ROBERTSON, R. R. Physiological and biochemical characterization of glyphosate resistant ambrosia trifida l.; Purdue University: West Lafayette, IN, USA, 2010.

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

SCHEPPER, V.; SWAEF, T.; BAUWERAERTS, I.; STEPPE, K. Phloem transport: a review of mechanisms and controls, **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 16, p. 4839–4850, 2013.

SCHMITTGEN, D.T.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1101-1108, 2008.

SCHONHERR, J.; P. BAUR. Modelling penetration of plant cuticles by crop protection agents and effects of adjuvants on their rates and penetration. **Pesticide Science**; v. 42, p. 185-208, 1994.

SCHONHERR, J. Effects of monodisperse alcohol ethoxylates on mobility of 2,4-D in isolated plant cuticles. **Pesticide Science**, v. 38, p. 155-164, 1993.

SHANER, D. L. Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. *Weed Scienc.* v. 57, n. 1, p. 118–123, 2009.

SICBALDI, F.; SACCHI, G. A.; TREVISAN, M.; DEL RE, A. A. Root uptake and xylem translocation of pesticides from different chemical classes. **Pesticide Science**, v. 50, n. 2, p. 111-119, 1997.

SILVA, D.V.; SANTOS, J.B.; FERREIRA, E.A.; SILVA, A.A.; FRANÇA, A.C.; SEDIYAMA, T. Manejo de plantas daninhas na cultura da mandioca. **Planta Daninha**, v. 30, n. 4, p. 901-910; 2012.

SILVA, V.V.; MENDES, R.; SUZUKAWA, A.; ADEGAS, F.; MARCELINO-GUIMARAES, F.; OLIVEIRA JR. A. Target-Site Mutation Confers Cross-Resistance to ALS-Inhibiting Herbicides in *Erigeron sumatrensis* from Brazil. **Plants**, n.11, v. 4, p. 467, 2022.

SIQUEIRA, R. H. S.; ALCÂNTARA, E. N.; FERREIRA, M. M.; CARVALHO, R. C. S.; Agregação de um latossolo vermelho-amarelo submetido a métodos de controle de plantas invasoras na cultura do café. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 6, p. 1128-1134, 2014.

STERLING, T.M.; BALKE, N.E.; SILVERMAN, D.S. Uptake and accumulation of the herbicide bentazon by cultured plant cells. **Plant Physiology**, v. 92, n. 4, p. 1121-1127, 1990.

STERLING, T.M.; LOWNDS, N.K. Picloram absorption by broom snakeweed (*Gutierrezia sarothrae*) leaf tissues. **Weed Science**, v. 40, p. 390-394, 1992.

SWANTON, C. J.; NKOA, R.; BLACKSHAW, R. E. Experimental methods for cropweed competition studies. **Weed Science**, v. 63, n. 11, 2015.

TAIZ, L. AND ZEIGER, E. *Plant Physiology*. 5th Edition, Sinauer Associates Inc., Sunderland, 782 p., 2010.

TAKANO, H.; OLIVEIRA JUNIOR, R.; CONSTANTIN, J.; BIFFE, D.; FRANCHINI, L.; BRAZ, G.; RIOS, F.; GHENO, E.; GEMELLI, A. Efeito da adição do 2,4-D ao glyphosate para o controle de espécies de plantas daninhas de difícil controle. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2013.

THEBAUD, C.; ABBOTT, R.J. Characterization of invasive *Conyza* species (Asteraceae) in Europe: quantitative trait e isozyme analysis. *American Journal of Botany*, Columbus, v.82, n.3, p.360-368, 1995.

TRANEL, P. J.; RIGGINS, C. W.; BELL, M. S.; HAGER, A. G. Herbicide Resistances in *Amaranthus tuberculatus*: A Call for New Options. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 11, p. 5808–5812, 2011.

TRAVLOS, I.S.; CHACHALIS, D. Relative competitiveness of glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible populations of hairy fleabane, *Conyza bonariensis*. **Journal of Pest Science**. v. 86, p. 345–351, 2013.

Urdampilleta, J. D.; Amat, A. G.; Bidau, C. J. Karyotypic studies e morphological analysis of some reproductive features in five species of *Conyza* Less. (Astereae: Asteraceae) from Northeastern Argentina. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 40, n. 1, p. 91-99, 2005.

VASCONCELOS, M. C. C.; SILVA, A. F. A; LIMA, R. S. Interferência de plantas daninhas sobre plantas cultivadas. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 8, n. 1, p.1-6, 2012.

VIDAL, R. A. Ação dos herbicidas. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002. 89 p.

VITTA, J., FACCINI, D., LEGUIZAMON, E., NISENSOHN, L., PAPA, J. C., PURICELLI, E., & TUESCA, D. Herbicidas: características y fundamentos de su actividad. *UNR Editora*, 2004.

WAGATSUMA, T. Effect of non-metabolic conditions on the uptake of aluminum by plant roots. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 29, p. 323-333, 1983.

WARABI, E.; USUI, K.; TANAKA, Y.; MATSUMOTO, H. Resistance of a soybean cell line to oxyfluorfen b overproduction of mitochondrial protoporphyrinogen oxidase. **Pest management Science**. v. 57, n. 8, p. 743-748, 2001.

WU, H., & WALKER, S. Fleabane biology and control. In *Fleabane*. Proceedings of a workshop held at DPI&F in Toowoomba, Australia, 25th February 2004 (pp. 5-6). CRC for Australian Weed Management, 2004

WYRILL, J. B.; BURNSIDE, O. C. Absorption, translocation, and metabolism of 2, 4-D and glyphosate in common milkweed and hemp dogbane. **Weed Science**, v. 24, n. 6, p. 557-566, 1976.

YAMASHITA, O.M.; GUIMARÃES, S.C. Germinação de sementes de *Conyza canadensis* e *bonariensis* em função da disponibilidade hídrica no substrato. **Planta daninha**, v. 28, n. 2, p. 309-3170, 2010

YUAN, G.; TIAN, Z.; LI, T.; QIAN, Z.; GUO, W.; SHEN, G. Cross-resistance pattern to ACCase-inhibiting herbicides in a rare Trp-2027-Ser mutation Chinese sprangletop (*Leptochloa chinensis*) population. **Chilean journal of agricultural research**, v. 81, n.1, p. 62-69, 2021.

ZHENG D.; KRUGER G. R.; SINGH S.; DAVIS V. M.; TRANEL P.J.; WELLER C. S.; 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.