

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

EFEITO DE INIBIDORES METABÓLICOS E ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA  
DE *Conyza sumatrensis* PARA CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO DE  
RESISTÊNCIA AO HERBICIDA 2,4-D RELACIONADO À RÁPIDA NECROSE

Paula Sinigaglia Angonese  
Engenheira Agrônoma/UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia  
Área de Concentração: Sistemas de Produção Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil  
Maio de 2022

### CIP - Catalogação na Publicação

Angonese, Paula Sinigaglia  
EFEITO DE INIBIDORES METABÓLICOS E ANÁLISE DO  
TRANSCRIPTOMA DE *Conyza sumatrensis* PARA  
CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA AO  
HERBICIDA 2,4-D RELACIONADO À RÁPIDA NECROSE / Paula  
Sinigaglia Angonese. -- 2022.  
141 f.  
Orientador: Aldo Merotto Jr.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,  
2022.

1. 2,4-D. 2. Resistência herbicida auxínico. 3.  
RNASeq. 4. Inibidores metabólicos. 5. *Conyza*  
*sumatrensis*. I. Merotto Jr, Aldo, orient. II. Título.

Paula Sinigaglia Angonese  
Engenheira Agrônoma - UFRGS

## **DISSERTAÇÃO**

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### **MESTRE EM FITOTECNIA**

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em:17/05/2022  
Pela Banca Examinadora

ALDO MEROTTO JR  
Orientador - PPG FITOTECNIA  
UFRGS

CARLA ANDRÉA DELATORRE  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia

ARTHUR ARROBAS MARTINS BARROSO  
Universidade Federal do Paraná

CATARINE MARKUS  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

MARCIA MARIA A NACHENVENG P MARGIS  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CARLOS ALBERTO BISSANI  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

Este trabalho é dedicado  
aos meus pais Paulo Angonese e Iane Sinigaglia Angonese e  
à minha irmã Liana Sinigaglia Angonese

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e pelas oportunidades.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação (PPG) em Fitotecnia pela oportunidade e estrutura oferecidas.

Ao professor Aldo Merotto Junior pela orientação acadêmica, oportunidades, ensinamentos, amizade, motivação e principalmente por seu exemplo.

À professora Catarine Markus pelos ensinamentos, amizade e apoio.

Aos meus pais Iane Sinigaglia Angonese e Paulo Angonese e minha irmã Liana Sinigaglia Angonese por todo carinho, incentivo e por sempre acreditarem em mim.

À minha avó Inez Gema Sinigaglia e toda minha família pelo carinho e incentivo.

Aos amigos da pós-graduação do grupo GUIHE Estéfani Sulzbach, Guilherme Menegol Turra e Luan Cutti pelo companheirismo e ensinamentos.

Aos amigos da iniciação científica Filipi, Gabriel, Liana, Othon, Pedro, Vinícius e Willian pelo companheirismo e ajuda nas atividades.

Aos amigos de Veranópolis e da faculdade pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos profissionais da saúde e pesquisadores por todo trabalho e dedicação durante a pandemia.

Aos funcionários da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aos servidores técnico-administrativos do Departamento Plantas de Lavoura e do PPG Fitotecnia pelo auxílio.

À Dr. Milene Ferro (UNESP) pelo grande auxílio nas análises do transcriptoma, ao professor Charley Christian Staats (UFRGS) pela disponibilização de equipamento para quantificação de RNA, ao Dr. Andrew de Queiroz e aos professores Arthur Germano Fett-Neto (UFRGS) e Richard Napier (University of Warwick) pelo auxílio nos estudos sobre os inibidores metabólicos.

Aos professores Arthur Arrobas Martins Barroso, Catarine Markus e Marcia Pinheiro Margis por aceitarem compor a banca de avaliação e contribuir com o trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento desta pesquisa.

# EFEITO DE INIBIDORES METABÓLICOS E ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE *Conyza sumatrensis* PARA CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA AO HERBICIDA 2,4-D RELACIONADO À RÁPIDA NECROSE<sup>1</sup>

Autora: Paula Sinigaglia Angonese  
Orientador: Prof. Aldo Merotto Jr.

## RESUMO

O mecanismo de resistência ao herbicida auxínico 2,4-D relacionado ao sintoma atípico de rápida necrose foliar em buva ainda é desconhecido. Os objetivos deste estudo foram caracterizar o mecanismo de resistência ao 2,4-D relacionado a rápida necrose em *Conyza sumatrensis* através da avaliação de inibidores metabólicos e da análise do transcriptoma. Foram realizados seis estudos com inibidores metabólicos aplicados em diferentes condições, cinco estudos para caracterização da sintomatologia e amostragem, e análise da expressão gênica diferencial através de RNA-Seq. Os inibidores de transportadores ABC orthovanadato e verapamil reduziram o acúmulo de peróxido de hidrogênio e a intensidade dos sintomas visuais, e causaram atraso da ocorrência de necrose em plantas resistentes em comparação ao tratamento com o herbicida isolado. Os inibidores do fotossistema II atrazina e diuron aplicados em hidroponia e a restrição de luz indicaram que alterações na fotossíntese afetam o início e a intensidade da resposta de rápida necrose ao herbicida 2,4-D, mas não condicionam a ocorrência da resistência. A análise da expressão diferencial de transcritos revelou que o efeito inicial do herbicida 2,4-D é mais intenso na repressão da expressão gênica em plantas suscetíveis e na indução da expressão de genes ao longo do tempo nas resistentes. A sobreposição dos genes diferencialmente expressos proporcionou a identificação de 104 genes envolvidos apenas nas primeiras sinalizações da resposta de resistência aos 5 min, 20 genes envolvidos nas sinalizações aos 5 e 30 min, e dois genes associados a todas as etapas de sinalização da resistência avaliadas (5, 30 e 60 min). A sinalização inicial da resposta de rápida necrose envolve o aumento da expressão de genes associados à resposta de defesa da planta a estresses após o tratamento com 2,4-D. O gene *PATATIN-LIKE PROTEIN 2 (PLP2)*, envolvido nas rotas de metabolismo de drogas e de glicerolípídeos foi identificado em todas as etapas de resposta da resistência avaliadas. A expressão de genes transportadores *PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE PROTEIN 1 (PDR1)* e *ATP BINDING CASSETTE SUBFAMILY (ABCB4 e ABCB12)* foi identificada na amostragem mais tardia, aos 60 min. A resposta de rápida necrose das plantas resistentes ao 2,4-D envolve diferentes processos que são desencadeados em sequência ao longo do tempo após o tratamento. Possivelmente, a resposta inicia com a percepção do 2,4-D como um elicitor patogênico que causa a rápida necrose do tecido e é seguida pela maior atividade de transportadores PDR1, ABCB4 e ABCB12 que proporciona a ocorrência do rebrote e retomada do crescimento das plantas.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (141f.) Maio, 2022.

# EFFECT OF METABOLIC INHIBITORS AND ANALYSIS OF THE TRANSCRIPTOME OF *Conyza sumatrensis* FOR CHARACTERIZATION OF THE 2,4-D HERBICIDE RESISTANCE MECHANISM RELATED TO RAPID NECROSIS<sup>1</sup>

Author: Paula Sinigaglia Angonese

Adviser: Prof. Aldo Merotto Jr.

## ABSTRACT

The mechanism of resistance to 2,4-D related to the atypical symptom of rapid leaf necrosis in Sumatran fleabane (*Conyza sumatrensis*) is still unknown. The objectives of this study were to characterize the mechanism of 2,4-D resistance related to rapid necrosis in Sumatran fleabane through the evaluation of metabolic inhibitors and transcriptome analysis. Six studies were carried out with metabolic inhibitors applied in different conditions, five studies for symptom characterization and sampling, and analysis of differential gene expression through RNA-Seq. The ABC transporter inhibitors orthovanadate and verapamil reduced the accumulation of hydrogen peroxide and the intensity of visual symptoms and caused a delay in the occurrence of necrosis in resistant plants compared to the treatment with the herbicide isolated. The photosystem II inhibitors atrazine and diuron applied in hydroponic conditions and the light restriction indicated that alterations in photosynthesis affect the onset and intensity of the rapid necrosis response to the 2,4-D herbicide but did not condition the occurrence of resistance. The analysis of the differential expression of transcripts revealed that the initial effect of the 2,4-D herbicide is more intense in the repression of gene expression in susceptible plants, and in the induction of gene expression over time in resistant plants. The overlap of the differentially expressed genes indicated that 104 genes were involved only in the first signaling of the resistance response at 5 min, 20 genes were related to the signaling at 5 and 30 min, and two genes were associated with all evaluated samplings (5, 30 and 60 min). The initial signaling of the rapid necrosis response involves increased expression of genes associated with the plant's defense response to stress after treatment with 2,4-D. The *PATATIN-LIKE PROTEIN 2 (PLP2)* gene, related to drug and glycerolipid metabolism pathways, was identified in all resistance response phases evaluated. The expression of *PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE PROTEIN 1 (PDR1)* and *ATP BINDING CASSETTE SUBFAMILY (ABCB4 e ABCB12)* transporter genes was identified in the later sampling, at 60 min. Thus, the rapid necrosis response of 2,4-D-resistant plants involves different processes that are triggered in sequence over time after treatment. Possibly, the response begins with the perception of 2,4-D as a pathogenic elicitor that causes rapid tissue necrosis and is followed by the increased activity of PDR1, ABCB4, and ABCB12 transporters, which allows regrowth and resumption of plant growth.

<sup>1</sup>Master Dissertation in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (141p.) May, 2022.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Objetivo geral.....	3
1.2 Objetivos específicos .....	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1 Caracterização de <i>Conyza</i> spp. ....	4
2.2 Mecanismos de resistência de plantas daninhas aos herbicidas auxínicos .....	6
2.3 Mecanismo de resistência a herbicidas por rápida necrose .....	9
2.3.1 Estudos com inibidores metabólicos.....	12
2.3.1.1 Transportadores de membranas e transporte de auxinas.....	12
2.3.1.2 Receptores de auxinas.....	13
2.3.1.3 Enzimas de detoxificação.....	14
2.3.2 Sequenciamento de RNA (RNA Seq).....	15
2.4 Referências .....	16
3 CAPÍTULO 1 .....	24
3.1 Introdução .....	26
3.2 Material e Métodos .....	29
3.2.1 Material vegetal e condições de crescimento .....	29
3.2.2 Avaliação do efeito de inibidores através da incubação de discos foliares ...	30
3.2.3 Avaliação do efeito de inibidores através de aspersão foliar.....	31
3.2.4 Avaliação do efeito de inibidores em solução hidropônica .....	32
3.2.5 Efeito de alterações da fotossíntese na ocorrência da rápida necrose.....	34
3.2.6 Análise dos dados .....	35
3.3 Resultados e Discussão.....	35
3.3.1 Avaliação do efeito de inibidores através da incubação de discos foliares ...	35
3.3.2 Avaliação do efeito de inibidores através de aspersão foliar.....	39
3.3.3 Avaliação do efeito de inibidores em solução hidropônica .....	45
3.3.4 Alterações na fotossíntese na ocorrência da rápida necrose .....	52
3.4 Conclusões .....	56



	Página
3.5 Referências .....	57
4 CAPÍTULO 2.....	61
4.1 Introdução .....	63
4.2 Material e Métodos .....	65
4.2.1 Material vegetal e condições de crescimento .....	65
4.2.2 Sintomatologia do herbicida e definição das condições de amostragem.....	66
4.2.3 Avaliação da expressão diferencial de genes através de RNA Seq .....	69
4.2.3.1 Tratamentos e condições de amostragem .....	69
4.2.3.2 Extração e purificação de RNA .....	71
4.2.3.3 Construção das bibliotecas de cDNA e sequenciamento de RNAm .....	71
4.2.3.4 Processamento das leituras, montagem de novo e mapeamento .....	72
4.2.3.5 Análise de expressão diferencial de genes e anotação funcional.....	73
4.3 Resultados e Discussão.....	74
4.3.1 Avaliação do padrão de evolução da sintomatologia do herbicida 2,4-D no fenótipo de rápida necrose .....	74
4.3.2 Sequenciamento do transcriptoma e mapeamento de leituras .....	88
4.3.3 Análise global da expressão de genes.....	89
4.3.4 Ontologia gênica dos genes diferencialmente expressos.....	95
4.3.4.1 Efeito do herbicida 2,4-D nas primeiras sinalizações da resistência .....	96
4.3.4.2 Efeito do herbicida 2,4-D nas sinalizações iniciais e intermediárias da resistência.....	98
4.3.4.3 Efeito do herbicida 2,4-D em todas as etapas de sinalização da resistência avaliadas.....	100
4.3.5 Busca de genes de interesse no transcriptoma de referência .....	101
4.3.6 Expressão diferencial de genes candidatos relacionados ao mecanismo de resistência.....	108
4.4 Conclusão .....	109
4.5 Referências .....	111
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	117
6 APÊNDICES.....	119

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 1 Efeito de inibidores metabólicos no fenótipo de rápida necrose em biótipo de buva resistente ao herbicida auxínico 2,4-D	
TABELA 1. Tratamentos utilizados nos experimentos de avaliação do efeito de inibidores na rápida necrose através da incubação de discos foliares, aspersão foliar e hidroponia.....	33
TABELA 2. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis injúria aos 2 e 28 DAT e massa fresca da parte aérea em biótipos de <i>Conyza sumatrensis</i> suscetível (LONDS4-S) e resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D após a aspersão do inibidor orthovanadato previamente ao 2,4-D (804 g ha <sup>-1</sup> ).....	43
TABELA 3. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis injúria aos 2 e 28 DAT e massa fresca da parte aérea em biótipos de <i>Conyza sumatrensis</i> suscetível (LONDS4-S) e resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D após a aspersão do inibidor verapamil previamente ao 2,4-D (804 g ha <sup>-1</sup> ).....	43
TABELA 4. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis injúria aos 1 e 10 DAT em biótipos de <i>Conyza sumatrensis</i> suscetível (LONDS4-S) e resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D após a aplicação de inibidores previamente a aplicação de 2,4-D nas concentrações de 100, 500, 1000, 2000 e 5000 µM em solução nutritiva.....	48
TABELA 5. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis injúria aos 1 e 10 DAT em biótipos de <i>Conyza sumatrensis</i> suscetível (LONDS4-S) e resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D após a aplicação de inibidores previamente a aspersão de 2,4-D nas doses de 0, 50, 101, 201, 402 e 804 g ha <sup>-1</sup> .....	51
CAPÍTULO 2 Sintomatologia do herbicida 2,4-D em plantas resistentes por rápida necrose e avaliação da expressão diferencial de genes através de RNA Seq	
TABELA 1. Experimentos para estudo do padrão de sintomatologia do herbicida 2,4-D.....	66

	Página
TABELA 2. Tratamentos para RNA Seq.....	71
TABELA 3. Genes de interesse para busca no transcriptoma de referência.....	74
TABELA 4. Presença de peróxido de hidrogênio (%) em discos foliares de <i>Conyza sumatrensis</i> resistente (MARPR9-RN) e suscetível (LONDS4-S) ao herbicida 2,4-D, coletados das plantas antes, 1, 15, 30, 60, 90, 120 e 200 min após a aplicação do herbicida 2,4-D na dose de 1608 g ha <sup>-1</sup> e de plantas controle não tratadas.....	75
TABELA 5. Presença de peróxido de hidrogênio (%) em discos foliares de <i>Conyza sumatrensis</i> resistente (MARPR9-RN) e suscetível (LONDS4-S) ao herbicida 2,4-D, coletados das plantas 1, 15, 30, 60 e 120 min após a aplicação de 0, 1, 2, 4 e 8 gotas do herbicida 2,4-D na concentração de 8,04 g L <sup>-1</sup> e área de rápida necrose foliar (%) 5 e 24 horas após o tratamento (HAT) com o herbicida.	78
TABELA 6. Parâmetros da equação log-logística para presença de peróxido de hidrogênio (%) após 1, 5, 10, 15, 20 e 25 min da aplicação do herbicida em discos foliares de <i>Conyza sumatrensis</i> suscetível (LONDS4-S) e resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D.....	81
TABELA 7. Parâmetros da equação log-logística para área de rápida necrose foliar (%) após 2 e 5 horas da aplicação do herbicida (HAT) em discos foliares de <i>Conyza sumatrensis</i> suscetível (LONDS4-S) e resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D.....	82
TABELA 8. Resultados da montagem <i>de novo</i> com Trinity do transcriptoma de <i>Conyza sumatrensis</i> .....	89
TABELA 9. Combinação dos tratamentos para análise de expressão diferencial de genes em <i>Conyza sumatrensis</i> .....	89
TABELA 10. Sequências identificadas dentro dos conjuntos de genes regulados positivamente apenas aos 5 min após o tratamento, regulados aos 5 e aos 30 min após o tratamento e regulados aos 5, 30 e 60 min no biótipo resistente de <i>Conyza sumatrensis</i> .....	96
TABELA 11. Alteração da expressão ( <i>fold change</i> ) de genes candidatos identificados com regulação positiva apenas aos 5 min após o tratamento, aos 5 e 30 min após o tratamento, aos 5, 30 e 60 min e apenas aos 60 min após o tratamento com 2,4-D em biótipo resistente de <i>Conyza sumatrensis</i> .....	108

## RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1	Efeito de inibidores metabólicos no fenótipo de rápida necrose em biótipo de buva resistente ao herbicida auxínico 2,4-D	
FIGURA 1.	Presença de peróxido de hidrogênio em discos foliares de <i>Conyza sumatrensis</i> resistente (MARPR9-RN) e suscetível (LONDS4-S) ao herbicida 2,4-D após tratamento com diferentes inibidores e 2 horas de incubação em solução de 2,4-D (9,09 mM). A coloração marrom dos tecidos indica a presença de estresse oxidativo.....	37
FIGURA 2.	Presença de peróxido de hidrogênio (%) em discos foliares de <i>Conyza sumatrensis</i> resistente (MARPR9-RN) (A) e suscetível (LONDS4-S) (B) ao herbicida 2,4-D após tratamento com diferentes inibidores e 2 horas de incubação em solução de 2,4-D (9,09 mM). Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).....	38
FIGURA 3.	Injúria relacionada à epinastia no biótipo suscetível (LONDS4-S) (A, C e E) e à rápida necrose no biótipo resistente ao herbicida 2,4-D (MARPR9-RN) (B, D e F) de <i>Conyza sumatrensis</i> aos 1 (A e B) e 28 (C e D) dias após tratamento (DAT) e matéria fresca da parte aérea (MFPA) (E e F) aos 28 dias após a aspersão de inibidores (dose conforme Tabela 1) e 2,4-D (804 g ha <sup>-1</sup> ). Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).....	40
FIGURA 4.	Injúria em plantas de <i>Conyza sumatrensis</i> resistentes (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D por rápida necrose após a aspersão do herbicida com tratamento dos inibidores orthovanadato (A e C) e verapamil (B e D) aos 2 (A e B) e 28 (C e D) DAT (dias após o tratamento).....	41
FIGURA 5.	Injúria aos 2 (A e B) e 28 (C e D) DAT (dias após o tratamento) e matéria fresca da parte aérea (MFPA) (E e F) aos 28 DAT em biótipos de <i>Conyza sumatrensis</i> resistente (MARPR9-RN) e suscetível (LONDS4-S) ao 2,4-D após aspersão do herbicida com tratamento dos inibidores orthovanadato (A, C, E) e verapamil (B, D, F). Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).....	42

FIGURA 6.	Injúria 1 dia após o tratamento (DAT) com o herbicida 2,4-D através da aplicação em solução nutritiva (A e B) e por aspersão (C e D) em biótipos de <i>Conyza sumatrensis</i> resistente (MARPR9-RN) (A e C) e suscetível (LONDS4-S) (B e D).....	45
FIGURA 7.	Tempo para início da rápida necrose após a aplicação do herbicida 2,4-D em solução nutritiva isolado ou precedido pela aplicação dos inibidores orthovanadato, verapamil e putrescina em biótipo de <i>Conyza sumatrensis</i> resistente (MARPR9-RN). Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).....	46
FIGURA 8.	Injúria aos 1 e 10 dias após a aplicação (DAT) do herbicida 2,4-D em solução nutritiva isolado (A) ou precedido pela aplicação dos inibidores orthovanadato (B), verapamil (C) e putrescina (D) em biótipo de <i>Conyza sumatrensis</i> resistente (MARPR9-RN). Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).....	47
FIGURA 9.	Tempo para início da rápida necrose após a aspersão do herbicida 2,4-D isolado ou precedido pela aplicação dos inibidores orthovanadato, verapamil e putrescina em biótipo de <i>Conyza sumatrensis</i> resistente (MARPR9-RN). Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).....	49
FIGURA 10.	Injúria aos 1 e 10 dias após a aspersão (DAT) do herbicida 2,4-D isolado (A) ou precedido pela aplicação dos inibidores orthovanadato (B), verapamil (C) e putrescina (D) em biótipo de <i>Conyza sumatrensis</i> resistente (MARPR9-RN). Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).....	50
FIGURA 11.	Tempo para início dos sintomas (min) (A) após a aplicação de inibidores do fotossistema II atrazina e diuron previamente a aplicação de 2,4-D (2000 $\mu$ M) e intensidade de injúria (%) relacionada à rápida necrose 1 dia após o tratamento (DAT) (B) em <i>Conyza sumatrensis</i> resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).....	53
FIGURA 12.	Tempo para início dos sintomas (min) (A), acúmulo de peróxido de hidrogênio (%) (B), área de necrose foliar (%) no início dos sintomas (C) e com sintomas consolidados (D) em biótipo de <i>Conyza sumatrensis</i> resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D após a aplicação de 2,4-D (4,02 g L <sup>-1</sup> ) em plantas mantidas em diferentes condições luminosas. Controle escuro: plantas não tratadas mantidas na ausência de luz; Controle luz: plantas não tratadas mantidas na presença de luz (400 $\mu$ mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ). Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).....	54

FIGURA 13.	Presença de peróxido de hidrogênio em discos foliares de <i>Conyza sumatrensis</i> resistente (MARPR9-RN) ao 2,4-D avaliada 1,5 horas após aplicação de 2,4-D (4,02 g L <sup>-1</sup> ) em plantas mantidas em diferentes condições de luminosidade. A coloração marrom dos tecidos indica a presença de estresse oxidativo. Controle escuro: plantas não tratadas mantidas na ausência de luz; Controle luz: plantas não tratadas mantidas na presença de luz (400 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ).....	55
CAPÍTULO 2 Sintomatologia do herbicida 2,4-D em plantas resistentes por rápida necrose e avaliação da expressão diferencial de genes através de RNA Seq		
FIGURA 1.	Fluxograma das etapas realizadas para avaliação da expressão diferencial de genes através do RNA Seq.....	70
FIGURA 2.	Presença de peróxido de hidrogênio em discos foliares de <i>Conyza sumatrensis</i> resistente (MARPR9-RN) e suscetível (LONDS4-S) ao herbicida 2,4-D, coletados das plantas antes, 1, 15, 30, 60, 90, 120 e 200 min após a aplicação do herbicida 2,4-D na dose de 1608 g ha <sup>-1</sup> e de plantas controle não tratadas. A coloração marrom dos tecidos indica a presença de estresse oxidativo.....	75
FIGURA 3.	Presença de peróxido de hidrogênio em discos foliares de <i>Conyza sumatrensis</i> resistente (MARPR9-RN) e suscetível (LONDS4-S) ao herbicida 2,4-D, coletados das plantas 1, 15, 30, 60, e 120 min após a aplicação de 0, 1, 2, 4 e 8 gotas do herbicida 2,4-D na concentração de 8,04 g L <sup>-1</sup> e de 4 gotas do herbicida picloram na concentração 2,40 g L <sup>-1</sup> . A coloração marrom dos tecidos indica a presença de estresse oxidativo.....	79
FIGURA 4.	Presença de peróxido de hidrogênio em discos foliares de <i>Conyza sumatrensis</i> resistente (MARPR9-RN) e suscetível (LONDS4-S) ao herbicida 2,4-D, coletados das plantas 1, 5, 10, 15, 20 e 25 min após a aplicação do herbicida nas concentrações de 0; 0,80; 2,01; 4,02 e 8,04 g L <sup>-1</sup> . A coloração marrom dos tecidos indica a presença de estresse oxidativo.....	80
FIGURA 5.	Presença de peróxido de hidrogênio (%) em discos foliares de <i>Conyza sumatrensis</i> resistente (MARPR9-RN) (A) e suscetível (LONDS4-S) (B) ao herbicida 2,4-D, coletados das plantas 1, 5, 10, 15, 20 e 25 min após a aplicação do herbicida nas concentrações de 0; 0,80; 2,01; 4,02 e 8,04 g L <sup>-1</sup> . Barras verticais indicam o intervalo de confiança (α = 0,05).....	81

FIGURA 6.	Área de rápida necrose foliar (%) em <i>Conyza sumatrensis</i> resistente (MARPR9-RN) e suscetível (LONDS4-S) ao herbicida 2,4-D, 2 e 5 horas após o tratamento (HAT) com o herbicida nas concentrações de 0; 0,80; 2,01; 4,02 e 8,04 g L <sup>-1</sup> . Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).....	82
FIGURA 7.	Presença de peróxido de hidrogênio em discos foliares de <i>Conyza sumatrensis</i> resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D, coletados de plantas mantidas a temperatura ambiente de 15, 20 e 25°C, 1, 5, 10, 15, 20 e 30 min após a aplicação do herbicida nas concentrações de 0; 2,01; 4,02; e 8,04 g L <sup>-1</sup> . A coloração marrom dos tecidos indica a presença de estresse oxidativo.....	84
FIGURA 8.	Presença de peróxido de hidrogênio (%) em discos foliares de <i>Conyza sumatrensis</i> resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D, coletados de plantas mantidas a temperatura ambiente de 15 (A), 20 (B) e 25°C (C), avaliados aos 1, 5, 10, 15, 20 e 30 min após a aplicação do herbicida nas concentrações de 0; 2,01; 4,02; e 8,04 g L <sup>-1</sup> . Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).....	85
FIGURA 9.	Área de rápida necrose foliar (%) em <i>Conyza sumatrensis</i> resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D, avaliada em 2, 5 e 24 horas após o tratamento (HAT) com o herbicida nas concentrações de 0; 2,01; 4,02; e 8,04 g L <sup>-1</sup> de plantas mantidas a temperatura ambiente de 15 (A), 20 (B) e 25°C (C). Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).....	86
FIGURA 10.	Ilustração da amostragem e condições experimentais definidas para coleta do material vegetal de <i>Conyza sumatrensis</i> suscetível (LONDS4-S) e resistente por rápida necrose (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D para o estudo de RNA Seq.....	87
FIGURA 11.	Genes diferencialmente expressos em resposta a aplicação dos herbicidas 2,4-D (H) e picloram (P) em relação a condição controle (C) em biótipos de <i>Conyza sumatrensis</i> suscetível (S) e resistente (R) ao 2,4-D com fenótipo de rápida necrose.....	91
FIGURA 12.	Diagramas de Venn da expressão diferencial de genes regulados negativamente (A) e positivamente (B) na análise do transcriptoma de biótipos resistente e suscetível de <i>Conyza sumatrensis</i> após 30 min da aplicação de 2,4-D; e genes regulados negativamente (C) e positivamente (D) na análise do biótipo resistente após 30 min da aplicação de picloram e do suscetível após o tratamento com 2,4-D. R - biótipo resistente, S - biótipo suscetível, H - tratamento com 2,4-D, P - tratamento com picloram, C - tratamento controle sem herbicida.....	92

FIGURA 13.	Diagramas de Venn da expressão diferencial de genes regulados negativamente (A) e positivamente (B) na análise do transcriptoma do biótipo resistente ao longo do tempo após a aplicação de 2,4-D; e genes regulados negativamente (C) e positivamente (D) na análise do transcriptoma do biótipo resistente após 30 min da aplicação de 2,4-D e picloram e do suscetível após o tratamento com 2,4-D. R - biótipo resistente, S - biótipo suscetível, H - tratamento com 2,4-D, P - tratamento com picloram, C - tratamento controle sem herbicida.....	94
FIGURA 14.	Diagramas de Venn da expressão diferencial de genes regulados negativamente (A) e positivamente (B) na análise do transcriptoma dos biótipos resistente e suscetível em todos os períodos de amostragem avaliados após a aplicação de 2,4-D. R - biótipo resistente, S - biótipo suscetível, H - tratamento com 2,4-D, C - tratamento controle sem herbicida.....	95
FIGURA 15.	Ontologia gênica dos 48 genes regulados positivamente com expressão diferencial identificados apenas na avaliação aos 5 min após o tratamento com 2,4-D no biótipo resistente (MARPR9-RN).....	98
FIGURA 16.	Ontologia gênica dos 13 genes regulados positivamente com expressão diferencial identificados na avaliação aos 5 min e aos 30 min após o tratamento com 2,4-D no biótipo resistente (MARPR9-RN).....	100
FIGURA 17.	Sequências de genes correspondentes a transportadores ABC no transcriptoma de <i>Conyza sumatrensis</i> . R - biótipo resistente, S - biótipo suscetível, H - tratamento com 2,4-D, P - tratamento com picloram, C - tratamento controle sem herbicida.....	105
FIGURA 18.	Descrição de genes regulados negativamente (A) e positivamente (B) correspondentes a transportadores ABC no transcriptoma de <i>Conyza sumatrensis</i> . R - biótipo resistente, S - biótipo suscetível, H - tratamento com 2,4-D, P - tratamento com picloram, C - tratamento controle sem herbicida.....	106
FIGURA 19.	Esquema teórico da resposta de rápida necrose e do rebrote de plantas de <i>Conyza sumatrensis</i> resistentes ao herbicida 2,4-D. PLP2 - PATATIN-LIKE PROTEIN 2; PDF1.2 - PLANT DEFENSIN 1.2; PDR1 - PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE PROTEIN 1; ABCB4 e ABCB12 - ATP BINDING CASSETTE SUBFAMILY.....	109



## 1 INTRODUÇÃO

Plantas daninhas do gênero *Conyza* apresentam grande diversidade genética, alto potencial competitivo e de dispersão, que resultam em grandes prejuízos em cultivos agrícolas (Dan *et al.*, 2013). O controle dessas espécies é dificultado pela evolução da resistência a herbicidas inibidores dos fotossistemas I e II, da enzima 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase (EPSPS) e da enzima acetolactato sintase (ALS) (Pinho *et al.*, 2019). Devido a isso, os herbicidas auxínicos 2,4-D e dicamba são a principal alternativa para o controle dessas espécies. Entretanto, a evolução da resistência ao glifosato, inibidor da EPSPS (Soares *et al.*, 2012) e a recente liberação de cultivares de algodão, milho e soja resistentes a 2,4-D e dicamba (BRASIL, 2017a; BRASIL, 2017b) potencializam o aumento da pressão de seleção desses herbicidas auxínicos sobre biótipos resistentes das espécies de *Conyza*.

Os herbicidas auxínicos são usados para o controle seletivo de plantas daninhas dicotiledôneas desde 1945, com a introdução do 2,4-D (Peterson *et al.*, 2016). Os primeiros casos de resistência a herbicidas auxínicos foram relatados para o 2,4-D em 1957, simultaneamente em *Commelina diffusa* nos Estados Unidos e em *Daucus carota* no Canadá (Hilton, 1957; Switzer, 1957). Atualmente são registrados 70 casos de resistência aos herbicidas desse mecanismo em plantas daninhas dicotiledôneas (Heap, 2022). Contudo, considerando a elevada pressão de seleção imposta pelo longo período de uso, a resistência a herbicidas auxínicos é baixa em relação a resistência a inibidores da EPSPS e da ALS (Peterson *et al.*, 2016). Entretanto, apenas alguns dos casos de resistência a herbicidas auxínicos tiveram o mecanismo caracterizado e, em geral, sua regulação molecular ainda é desconhecida (Todd *et al.*, 2020).

Biótipos de *Conyza sumatrensis* resistentes ao 2,4-D foram identificados no estado do Paraná em 2015. Cerca de 2 h após a aplicação do herbicida, as plantas resistentes desenvolvem um fenótipo atípico de rápida necrose nos tecidos foliares e após 21 dias ocorre a retomada do crescimento a partir das gemas axilares (Queiroz *et al.*, 2020). Não

existe relato na literatura de casos semelhantes de resistência a herbicidas auxínicos para outras espécies (Torra *et al.*, 2021; Figueiredo *et al.*, 2022). Contudo, fenótipo similar de rápida necrose foliar foi identificado em plantas de *Ambrosia trifida* resistentes ao herbicida glifosato (Brabham *et al.*, 2011). A ausência de relatos anteriores sugere a ocorrência de um novo mecanismo de resistência a herbicidas auxínicos em *C. sumatrensis*.

A resistência por rápida necrose em plantas de *C. sumatrensis* ocorre apenas para os herbicidas auxínicos do grupo dos ácidos fenoxicarboxílicos, 2,4-D e MCPA. Esses sintomas atípicos não foram observados em resposta a aplicação de outros herbicidas auxínicos ou ao glifosato (Queiroz *et al.*, 2020). Entretanto, foi constatado efeito antagônico nas plantas resistentes com os herbicidas auxínicos dicamba, halauxifen e triclopyr, quando aplicados em conjunto, 4 h ou 24 h após a aplicação do 2,4-D (Queiroz, 2019). Nessas plantas, também foi observada elevada produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) aos 15 minutos após a aplicação do herbicida 2,4-D, processo semelhante ao observado na resposta de hipersensibilidade a patógenos em plantas (Queiroz *et al.*, 2020). Além disso, foi verificado que as condições ambientais afetam a resposta de rápida necrose. Nas condições de baixa luminosidade ( $29 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e baixa temperatura ( $12^\circ\text{C}$ ) a produção de  $H_2O_2$  foi reduzida e ocorreu atraso no início dos sintomas em comparação as condições de maior intensidade luminosa ( $848 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e temperatura ( $30^\circ\text{C}$ ) (Queiroz, 2019; Queiroz *et al.*, 2020). Entretanto, a produção de  $H_2O_2$  após a aplicação de 2,4-D não é dependente da presença de luz e ocorre mesmo na condição de escuro em plantas resistentes de *C. sumatrensis* (Leal *et al.*, 2022).

O mecanismo de resistência por rápida necrose em plantas de *C. sumatrensis* ainda não é conhecido e os genes e rotas metabólicas envolvidos não foram descritos. Contudo, ao avaliar o efeito de inibidores no fenótipo de rápida necrose e na produção de  $H_2O_2$  foi observado que tanto, inibidores de transportadores ABC e de auxinas, como inibidores de enzimas de detoxificação não revertem o fenótipo de resistência (Queiroz *et al.*, 2022). Neste trabalho foi identificado que os inibidores de transportadores, orthovanadato e azida sódica reduziram parcialmente o estresse oxidativo de discos foliares do biótipo resistente. Outro estudo identificou que atividade basal das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) foi superior nas plantas resistentes de *C. sumatrensis* em comparação com as suscetíveis, apesar de não diferir entre plantas resistentes não tratadas e tratadas com o herbicida (Leal *et al.*, 2022). Esses resultados indicam que os efeitos destas enzimas são possivelmente

associados as consequências do estresse oxidativo relacionado a rápida necrose e não com a causa do mecanismo de resistência.

A expressão dos genes *ABCM10* (*ABC-C FAMILY MRP10* - gene transportador ABCD), *TIR1\_1* (*TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1* - gene receptor de auxinas), *CALS1* (*CALLOSE SYNTHASE 1* - biossíntese de calose) e *CAT4* (*CATIONIC AMINO ACID TRANSPORTER 4* - gene transportador de aminoácidos) foi rapidamente reduzida após o tratamento com 2,4-D nas plantas resistentes de *C. sumatrensis*. Enquanto que, a expressão do gene *LSD1\_3* (*LESION SIMULATING DISEASE 1* - gene de resposta a estresses) aumentou após a aplicação do herbicida (Queiroz *et al.*, 2022). Esses resultados indicam que o mecanismo de rápida necrose provavelmente não está relacionado à detoxificação do herbicida 2,4-D por enzimas citocromo P450 monooxigenases (cytP450) e glutiona S transferase (GST), mas pode envolver alterações no transporte de auxinas ou no receptor TIR1 (Queiroz *et al.*, 2022). Estudos complementares com inibidores e o sequenciamento de RNA (RNA Seq) de plantas resistentes e suscetíveis, tratadas e não tratadas, podem contribuir para identificação do mecanismo de resistência por rápida necrose.

### **1.1 Objetivo geral**

Caracterizar o mecanismo de resistência ao herbicida 2,4-D por rápida necrose em biótipo de *Conyza sumatrensis*.

### **1.2 Objetivos específicos**

- i) Avaliar o efeito de inibidores metabólicos na reversão dos sintomas relacionados à rápida necrose em interação com a avaliação da produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) após a aplicação do herbicida 2,4-D.
- ii) Desenvolver metodologia de amostragem de tecido vegetal relacionada a dinâmica do processo de ocorrência da rápida necrose causada por 2,4-D em buva.
- iii) Avaliar a expressão diferencial de genes associados com a ocorrência da rápida necrose causada por 2,4-D em buva através de RNA Seq.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Caracterização de *Conyza* spp.

O gênero *Conyza*, pertencente à família Asteraceae, possui cerca de 50 espécies de plantas, conhecidas popularmente por buva ou voadeira (Kissmann & Groth, 1999). As principais espécies desse gênero descritas como infestantes de cultivos em diferentes regiões do mundo, inclusive no Brasil são *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist, *Conyza canadensis* (L.) Cronquist e *Conyza sumatrensis* (Retz.) E. Walker (Santos *et al.*, 2013). Essas espécies são originárias das Américas, sendo *C. canadensis* nativa da América do Norte (Frankton & Mulligan, 1987), e *C. bonariensis* e *C. sumatrensis* originárias da América do Sul (Thebaud & Abbott, 1995; Kissmann & Groth, 1999). Estas espécies se estabelecem principalmente em áreas perturbadas (Tremmel & Peterson, 1983), como lavouras de milho, soja e algodão, culturas forrageiras, pastagens e pomares, além de ambientes não cultivados (Lazaroto *et al.*, 2008).

Plantas do gênero *Conyza* são consideradas autógamas, auto compatíveis e prolíficas (Green, 2010). As estimativas de produção de sementes por planta são superiores a 60.000 sementes para *C. sumatrensis* (Hao *et al.*, 2009), cerca de 200.000 sementes em *C. canadensis* (Shields *et al.*, 2006) e até 878.000 sementes para *C. bonariensis* (Kaspary *et al.*, 2017). A elevada prolificidade pode favorecer a rápida disseminação e dispersão da espécie (Santos *et al.*, 2013). As sementes de buva são leves e a presença de pappus nos frutos favorece a dispersão pelo vento (Andersen, 1993). As sementes podem ser dispersas a mais de 500 km de distância da planta na camada limítrofe da atmosfera em condições em que a velocidade do vento é superior a  $20 \text{ m s}^{-1}$  (Shields *et al.*, 2006). Entretanto, 99% das sementes são dispersas em até 100 metros de distância da planta de origem (Dauer *et al.*, 2006). As sementes não apresentam

dormência e podem germinar prontamente após a dispersão quando as condições de temperatura, luz e umidade são favoráveis (Wu *et al.*, 2007).

As sementes de buva não possuem grande longevidade em comparação com a maioria das plantas daninhas. Após três anos enterradas no solo, nas profundidades de 10, 5 e 0-2 cm, apenas 7,5%, 9,7% e 1,3% das sementes de *C. bonariensis* apresentaram-se viáveis, respectivamente (Wu *et al.*, 2007). Além disso, as sementes são fotoblásticas positivas e não germinam em profundidades do solo superiores a 0,5 cm (Nandula *et al.*, 2006). A temperatura ótima de germinação para *C. bonariensis* e *C. canadensis* é estimada em 20°C (Vidal *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007), apresentando elevada germinação com incidência de 13 horas de luz e em condições de solo com pH neutro a alcalino (Nandula *et al.*, 2006). Contudo, as características de germinação das diferentes populações de buva são influenciadas pelo ambiente de desenvolvimento da planta de origem. Sementes provenientes de regiões áridas e semiáridas apresentaram maior potencial de germinação em comparação com populações de ambiente temperado e úmido, tanto sob condições ambientais ótimas, como sob estresse ambiental (Xu *et al.*, 2021).

Os principais danos causados pelas espécies de buva estão relacionados ao seu alto potencial competitivo e à elevada capacidade de reduzir a produtividade de diferentes culturas mesmo em baixas densidades de infestação (Oliveira Neto *et al.*, 2013). No cultivo do algodão foi observada redução de 46% da produtividade da fibra na presença de população de 20 plantas m<sup>-2</sup> de *C. canadensis* durante todo o ciclo da cultura (Steckel & Gwathmey, 2009). Na cultura da soja as perdas no rendimento de grãos podem corresponder a 48% em níveis de infestação com 18 plantas m<sup>-2</sup> (Gazziero *et al.*, 2010), e 36%, 12% e 1% quando o estabelecimento de *C. bonariensis* ocorre aos 81, 38 e 0 dias antes da semeadura da soja, respectivamente (Trezzi *et al.*, 2014).

As espécies do gênero *Conyza* se destacam como plantas daninhas em função da sua habilidade reprodutiva e a ampla diversidade genética, fatores que também favorecem o surgimento de biótipos resistentes a herbicidas e dificulta seu manejo nas lavouras (Dan *et al.*, 2013). Os primeiros casos de resistência a herbicidas em espécies de buva surgiram em 1980, no Japão e em Taiwan, em biótipos de *C. canadensis* e *C. sumatrensis*, respectivamente. Ambos os biótipos apresentavam resistência ao herbicida paraquat, inibidor do fotossistema I (FSI) (Fuerst *et al.*, 1985). Em 1982, foram relatados os primeiros casos de resistência em *C. canadensis* aos herbicidas simazine e atrazine, inibidores do fotossistema II (FSII) no Reino Unido e na Suíça (Lehoczki *et al.*, 1984).

Em *C. bonariensis* o primeiro relato de resistência foi descrito em 1987 na Espanha, em plantas resistentes a simazine (Shaaltiel & Gressel, 1987). O primeiro relato de buva com resistência múltipla a herbicidas foi registrado em 1993 em Israel, em biótipos de *C. canadensis* resistentes a herbicidas inibidores do FSII e da acetolactato sintase (ALS) (Heap, 2022). Nos Estados Unidos, no ano de 2000, foi relatada a ocorrência de biótipo de *C. canadensis* resistente ao herbicida glifosato, inibidor da enzima 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase (EPSPs) (Vangessel, 2001). No Brasil, o primeiro caso de resistência a herbicidas em buva foi observado em plantas de *C. bonariensis* e *C. canadensis* ao glifosato em 2005 (Vargas *et al.*, 2007).

Atualmente, são registrados diversos casos de resistência das espécies do gênero *Conyza* ao herbicida glifosato (Heap, 2022). Casos de resistência múltipla ao glifosato e ao clorimuron (inibidor da ALS) foram relatados a partir de 2011 no Brasil, limitando o uso desses dois mecanismos de ação (Santos *et al.*, 2014). Em função disso, para o controle dessas espécies são utilizados herbicidas de outros mecanismos de ação, principalmente 2,4-D, mimetizador de auxinas; glufosinato de amônio, inibidor da enzima glutamina sintetase (GS) e saflufenacil, inibidor da enzima protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) (Steckel *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2012). Entretanto, a intensificação do uso desses herbicidas também pode contribuir para o surgimento de biótipos com resistência a esses mecanismos de ação (Dan *et al.*, 2013). De fato, recentemente no Brasil, foi registrado o primeiro caso de resistência ao 2,4-D em biótipo de *C. sumatrensis*, além de resistência múltipla a herbicidas de outros quatro mecanismos de ação (diuron, paraquat, glifosato e saflufenacil) (Pinho *et al.*, 2019).

## **2.2 Mecanismos de resistência de plantas daninhas aos herbicidas auxínicos**

Os herbicidas auxínicos atuam mimetizando o hormônio vegetal ácido indol-3-acético (AIA) (Busi *et al.*, 2018) e são usados para o controle seletivo de plantas daninhas dicotiledôneas (Peterson *et al.*, 2016). Os herbicidas ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA) e 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D) foram os primeiros herbicidas orgânicos seletivos desenvolvidos, em pesquisas independentes no Reino Unido e nos Estados Unidos durante a Segunda Guerra Mundial (Cobb *et al.*, 2010). Herbicidas desse grupo são utilizados no controle de plantas daninhas desde o início da comercialização do 2,4-D em 1945. A introdução do 2,4-D para usos agrícolas revolucionou o manejo de plantas daninhas e deu início ao processo de descoberta e desenvolvimento de novos herbicidas

auxínicos (Peterson *et al.*, 2016). A molécula dos herbicidas auxínicos é composta por um anel aromático e um radical ácido carboxílico, semelhante à auxina natural AIA. Esses herbicidas são divididos em cinco classes conforme o tipo de anel aromático e a localização do radical ácido carboxílico na estrutura da molécula. As classes são: ácidos fenoxicarboxílicos (ex. 2,4-D e MCPA), ácidos benzoicos (ex. dicamba), ácidos piridinocarboxílicos (ex. picloram, clopyralid, halauxifen e florypyrauxifen), ácidos quinolinocarboxílicos (ex. quinclorac e quinmerac) e ácidos pirimidinocarboxílicos (ex. aminocyclopyrachlor) (Christoffoleti *et al.*, 2015; Epp *et al.*, 2016).

O mecanismo de ação de herbicidas auxínicos está relacionado a degradação de reguladores de transcrição de auxinas da família AUX/IAA devido a ação desses herbicidas na interação entre AUX/IAA e o receptor de auxina TIR1/AFB (Hagen & Guilfoyle, 2002; Tan *et al.*, 2007; Villalobos *et al.*, 2012; Kubes & Napier, 2019). Quando a concentração de auxina está em equilíbrio na planta as proteínas repressoras se ligam aos fatores de resposta à auxina (ARFs) impedindo sua associação a genes responsivos à auxina e a consequente morte da planta (Grossmann, 2010). Entretanto, após a aplicação de herbicidas auxínicos a concentração de auxinas aumenta nas células da planta, promovendo a indução da proteólise de AUX/IAA e liberando os ARFs. Os ARFs induzem os genes responsivos à auxina (Grossmann, 2010; Gaines, 2020) e a planta desenvolve os sintomas característicos de epinastia foliar, espessamento de caules e raízes, clorose e necrose das folhas, o que resulta na morte da planta (Song, 2014).

A seletividade de herbicidas auxínicos é promovida pela metabolização diferencial. Em espécies monocotiledôneas tolerantes o herbicida é hidroxilado e conjugado irreversivelmente com glicose pela ação de enzimas citocromo P450 monooxigenases (cytP450), e assim, não afeta o equilíbrio hormonal da planta. Em plantas dicotiledôneas sensíveis a conjugação do herbicida auxínico ocorre com aminoácidos devido à atividade da proteína GH3. Contudo, esse processo é facilmente revertido e a molécula herbicida retorna a forma ativa, desencadeando a indução dos genes responsivos que resultam na morte da planta (Wu *et al.*, 2016; Figueiredo *et al.*, 2018).

Os herbicidas auxínicos têm sido utilizados com sucesso no controle de plantas daninhas dicotiledôneas por diversas décadas. Entretanto, a resistência a esses herbicidas foi relatada para diferentes espécies, apesar do número de casos de resistência ser baixo em relação a resistência a inibidores da EPSPS e da ALS (Peterson *et al.*, 2016; Heap, 2022). Os primeiros casos de resistência a herbicidas auxínicos foram relatados para o 2,4-D em 1957, simultaneamente em *Commelina diffusa* nos Estados Unidos e em

*Daucus carota* no Canadá (Hilton, 1957; Switzer, 1957). Atualmente são registrados 47 casos de resistência ao herbicida 2,4-D, 19 casos de resistência a dicamba, seis casos a fluroxypyr e cinco casos ao picloram, em 26, sete, quatro e cinco diferentes espécies de plantas daninhas, respectivamente (Heap, 2022).

A resistência a herbicidas em geral ocorre por meio de mecanismos relacionados à alteração do local de ação do herbicida devido a mutações na enzima alvo, ou a mecanismos não relacionados ao local de ação que envolvam absorção e translocação reduzida, compartimentalização no vacúolo ou metabolização (Gaines *et al.*, 2020). Porém, o mecanismo de resistência a herbicidas auxínicos ainda é desconhecido para maioria das espécies de plantas daninhas. Apenas alguns dos casos de resistência a herbicidas auxínicos tiveram o mecanismo caracterizado e, em geral, sua regulação molecular ainda é desconhecida (Todd *et al.*, 2020). Estudos recentes caracterizaram mutações em receptores que causam insensibilidade às auxinas, metabolização e restrição de translocação das auxinas como processos envolvendo a resistência a herbicidas auxínicos (Goggin *et al.*, 2016; LeClere *et al.*, 2018; Figueiredo *et al.*, 2022).

Em populações de *Papaver rhoeas* com resistência múltipla a herbicidas auxínicos e inibidores da ALS foram identificadas inicialmente a redução da translocação do herbicida 2,4-D e da produção de etileno em comparação com plantas suscetíveis como possível mecanismo de resistência (Rey-Caballero *et al.*, 2016). Contudo, estudo mais recente identificou a atividade de enzimas cytP450 na metabolização do herbicida 2,4-D como principal processo envolvido na sobrevivência dessas plantas. Nessas populações, a ação dessas enzimas promove a metabolização tanto do herbicida 2,4-D como de herbicida inibidor da ALS, conferindo resistência múltipla a dois mecanismos de ação (Torra *et al.*, 2021). Em trabalho realizado com plantas de *Amaranthus tuberculatus* resistentes ao 2,4-D não foram encontradas diferenças na absorção e translocação do 2,4-D entre plantas resistentes e suscetíveis. Porém, a aplicação prévia de malathion, inibidor de enzimas cytP450, reduziu em sete vezes a GR50 (dose que ocasiona 50% de redução do crescimento) do material resistente, indicando a detoxificação do 2,4-D como provável mecanismo de resistência (Figueiredo *et al.*, 2018).

O mecanismo de resistência ao 2,4-D em *Raphanus raphanistrum* foi identificado como translocação reduzida do herbicida na planta. A redução do processo de translocação não ocorreu devido ao sequestro da molécula no vacúolo ou por redução da absorção do herbicida pelas folhas (Goggin *et al.*, 2016). A aplicação de inibidor de transportadores ABCB relacionados ao efluxo de auxinas promoveu fenótipo de



translocação reduzida em plantas suscetíveis ao 2,4-D, indicando que a resistência pode estar relacionada a alterações na atividade de transportadores ABCB na membrana plasmática (Goggin *et al.*, 2016). Estudo mais recente identificou duas quinases semelhantes a receptores de função desconhecida (LRK1 e At1g51820), possivelmente relacionadas à percepção de auxinas e transportador de auxina ABCB19 como associados à resistência ao 2,4-D nas populações de *R. raphanistrum* com alteração na translocação do herbicida (Goggin *et al.*, 2020).

Alterações no co-receptor de auxinas AUX/IAA foram relacionadas a resistência a dicamba e 2,4-D em populações de *Kochia scoparia* e *Sisymbrium orientale*, respectivamente (LeClere *et al.*, 2018; Figueiredo *et al.*, 2022). Alterações nesse gene afetam a formação do complexo entre receptor TIR1/AFB, herbicida e AUX/IAA, impedindo a degradação do co-receptor e a consequente ativação transcricional dos genes responsivos as auxinas que promovem a morte da planta. Na população de *K. scoparia* resistente a alteração ocorreu devido a substituição do aminoácido glicina por uma asparagina no co-receptor Aux/IAA16 (LeClere *et al.*, 2018). Em *S. orientale* a alteração que promove a resistência ao 2,4-D foi identificada como a deleção de 27 nucleotídeos, responsável pela perda de nove aminoácidos no co-receptor Aux/IAA2 (Figueiredo *et al.*, 2022). Esses são os dois primeiros casos de resistência a herbicidas auxínicos em plantas daninhas cujo mecanismo de resistência foi identificado como relacionado ao local de ação. Outros casos de resistência a esses herbicidas podem estar relacionados a alterações no co-receptor de auxinas AUX/IAA.

### **2.3 Mecanismo de resistência a herbicidas por rápida necrose**

Um novo mecanismo de resistência a herbicidas através da rápida necrose dos tecidos foliares foi observado em plantas de *Ambrosia trifida* resistentes ao herbicida glifosato (Brabham *et al.*, 2011) e em plantas de *Conyza sumatrensis* ao herbicida 2,4-D (Queiroz *et al.*, 2020). Essas plantas resistentes apresentam sintomas atípicos de rápida necrose foliar em resposta a aplicação desses herbicidas sistêmicos, com sintomas semelhantes ao observado no processo de hipersensibilidade ao ataque de patógenos em plantas, o qual induz a morte celular localizada (Aviv *et al.*, 2002). A resistência em *A. trifida* foi inicialmente relatada em 2005, em Ohio nos Estados Unidos (Brabham *et al.*, 2011). Enquanto que a resistência em *C. sumatrensis* foi identificada no Paraná, em 2015 (Queiroz *et al.*, 2020). Contudo, o mecanismo relacionado à ocorrência da resistência em

ambas as espécies por rápida necrose ainda não foi caracterizado e a regulação molecular é desconhecida.

Em plantas de *A. trifida* resistentes ao glifosato foi observada a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 h após a aplicação do herbicida e a ocorrência de necrose foliar localizada 2 h após a aplicação em folhas maduras (Jeffery, 2014). Folhas imaturas e meristemas, mesmo quando aspergidos, não apresentaram sintomas de necrose. A translocação do herbicida nessas plantas foi reduzida em comparação com biótipos suscetíveis (Moretti *et al.*, 2018). Contudo, não foram identificadas alterações na sequência ou no número de cópias do gene *EPSPS* entre os biótipos resistente e suscetível (Van Horn *et al.*, 2018). Também foi descrito que a resistência por rápida necrose em *A. trifida* não foi causada pelos processos de sequestro no vacúolo, local de ação alterado ou amplificação do gene alvo, mecanismos de resistência descritos em outras espécies resistentes ao glifosato (Moretti *et al.*, 2018; Van Horn *et al.*, 2018). Além disso, foi identificado antagonismo do sintoma de rápida necrose com os herbicidas atrazina, cloransulam, dicamba, lactofen e topramezona no biótipo resistente (Harre *et al.*, 2018).

No biótipo de *C. sumatrensis* com rápida necrose os sintomas de 2,4-D foram observados apenas em folhas maduras, sem ocorrência em meristemas e folhas jovens. A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi observada 15 minutos após a aplicação do 2,4-D e os sintomas visuais de rápida necrose ocorrem em 2 h após o tratamento (Queiroz *et al.*, 2020). A resistência foi identificada apenas para os herbicidas do grupo dos ácidos fenoxicarboxílicos, 2,4-D e MCPA. Os sintomas não ocorreram em resposta à aplicação de herbicidas auxínicos dos outros grupos (dicamba, floryrauxifen-benzyl, fluroxypyr, halauxifen-methyl, picloram, triclopyr). Os sintomas também não foram observados para glifosato, apesar das plantas apresentarem resistência a esse herbicida (Queiroz *et al.*, 2020). Contudo, foi identificado efeito antagônico desse mecanismo no controle das plantas resistentes com os herbicidas auxínicos dicamba, halauxifen e triclopyr, quando aplicados em conjunto, 4 h ou 24 h após a aplicação do 2,4-D (Queiroz, 2019).

As condições ambientais afetam a resposta de rápida necrose das plantas de *A. trifida* e *C. sumatrensis* resistentes. Nas condições de baixa luminosidade (29  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e baixa temperatura (12°C) a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi reduzida em *C. sumatrensis* e ocorreu atraso no início dos sintomas em comparação as condições de maior intensidade luminosa (848  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e temperatura (30°C) (Queiroz, 2019; Queiroz *et al.*, 2020). Contudo, a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não é dependente da presença de luz nessa espécie e o sintoma ocorre mesmo na condição de escuro (Leal *et al.*, 2022). Plantas de *A. trifida*

mantidas na temperatura de 30°C produziam maior quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após a aplicação de glifosato em comparação a plantas em condição de baixa temperatura (10°C) (Harre *et al.*, 2018). Nesta espécie, também foi observada redução do sintoma de rápida necrose na ausência de luz (Moretti *et al.*, 2018).

A herança da resistência por rápida necrose em *A. trifida* é um caráter semidominante, controlado a partir da expressão de genes localizados no núcleo celular (Jeffery, 2014). Análises preliminares de RNA Seq realizadas em plantas suscetíveis e resistentes ao glifosato indicaram aumento da expressão de genes envolvidos na resposta a patógenos em plantas resistentes por rápida necrose em *A. trifida* (Padmanabhan *et al.*, 2016). Em *C. sumatrensis* foi avaliada a expressão em plantas resistentes e suscetíveis de genes relacionados a resposta a estresses, genes transportadores e receptores de auxinas. O gene de resposta a patógenos e estresses abióticos *LSD1\_3* (*LESION SIMULATING DISEASE 1*) apresentou aumento da expressão no tratamento com 2,4-D no biótipo resistente (Queiroz *et al.*, 2022). Entretanto, a expressão dos genes *ABCM10* (*ABC-C FAMILY MRP10* - gene transportador ABCD), *TIR1\_1* (*TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1* - gene receptor de auxinas), *CALS1* (*CALLOSE SYNTHASE 1* - biossíntese de calose) e *CAT4* (*CATIONIC AMINO ACID TRANSPORTER 4* - gene transportador de aminoácidos) foi rapidamente reduzida nas plantas resistentes tratadas com 2,4-D (Queiroz *et al.*, 2022).

O estudo do mecanismo de resistência em *C. sumatrensis* também foi realizado com inibidores metabólicos. Compostos inibidores de enzimas relacionadas ao transporte e detoxificação do herbicida e ao estresse oxidativo foram avaliados através da aspersão prévia ao 2,4-D nas plantas e através da incubação de discos foliares em solução, seguida pela incubação em solução do herbicida por duas horas (Queiroz *et al.*, 2022). Ao avaliar o efeito desses inibidores no fenótipo de rápida necrose e na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de *C. sumatrensis* foi observado que tanto, inibidores de transportadores ABC e de auxinas, como inibidores das enzimas de detoxificação cytP450 e glutationa-S-transferase (GST) não reverteram o fenótipo de resistência. No entanto, os inibidores de transportadores orthovanadato e azida sódica reduziram parcialmente o estresse oxidativo de discos foliares do biótipo resistente. Esses resultados indicam que o mecanismo de rápida necrose possivelmente não está relacionado à detoxificação do herbicida 2,4-D por enzimas cytP450 e GST como processo principal, mas pode envolver alterações no transporte de auxinas ou no receptor TIR1 (Queiroz *et al.*, 2022). Ainda, a atividade basal das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato

peroxidase (APX) foi superior nas plantas de *C. sumatrensis* resistentes em comparação com as suscetíveis. Contudo, a atividade de todas as enzimas não diferiu entre plantas resistentes não tratadas e tratadas com o herbicida (Leal *et al.*, 2022). Também foi identificada redução no índice de desempenho da cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos em biótipo resistente 1 h e 4 h após a aplicação do herbicida. No biótipo suscetível essas alterações metabólicas foram detectadas somente após 4 h da aplicação (Leal *et al.*, 2022).

### 2.3.1 Estudos com inibidores metabólicos

#### 2.3.1.1 Transportadores de membranas e transporte de auxinas

O movimento das moléculas de auxina na planta pode ser realizado a longas distâncias pelo floema, via fluxo de massa, ou a curtas e longas distâncias por meio de um mecanismo polar de transporte célula-a-célula (Zazímalová *et al.*, 2010). Esse mecanismo envolve a condição de pH do meio e a ação de transportadores. As auxinas são ácidos fracos e sua capacidade de atravessar a membrana é dependente do pH. As auxinas mantidas na forma protonada são capazes de atravessar a membrana plasmática por difusão simples no pH 5,5 da parede celular. Entretanto, auxinas presentes na forma desprotonada no ambiente alcalino do citosol não podem ser transportadas ativamente para fora da célula. Nesses ambientes, o transporte é mediado por transportadores específicos (Michniewicz *et al.*, 2007; Zazímalová *et al.*, 2010). Os principais transportadores de auxinas são os transportadores simplásticos AUX1/LAX (AUXIN RESISTANT 1/LIKE AUX1), transportadores de efluxo PIN (PIN-FORMED) e transportadores de efluxo ou condicionais P-glicoproteína (MDR/ABCB/PGP) (Zazímalová *et al.*, 2010; Geisler, 2021).

A direção do transporte intracelular de auxina na membrana plasmática é determinada pelos transportadores PINs, presentes na membrana plasmática e no retículo endoplasmático (Zazímalová *et al.*, 2010). Com a energia da hidrólise de ATP, os transportadores ABC realizam o transporte de diversas moléculas através da membrana celular. Esses transportadores estão envolvidos no transporte polar de auxinas, dentre outros processos (Geisler, 2021). Os transportadores da subfamília P-glicoproteína (MDR/ABCB/PGP), ABCB1, ABCB4, ABCB14, ABCB15 e ABCB19 tem função primária no transporte de auxinas (Cho & Cho, 2013). Entretanto, em *Arabidopsis*

*thaliana* também ocorre a participação de outras subclasses de transportadores ABC na resistência a herbicidas. Nessa espécie observou-se que uma mutação semidominante no gene *PDR9* (transportador ABC - homólogo PDR) proporcionou o aumento da tolerância das plantas ao herbicida 2,4-D, enquanto que a perda de função desse gene conferiu aumento da sensibilidade ao herbicida, pela inibição do crescimento de raízes (Ito & Gray, 2006).

Os transportadores AUX1/LAX pertencem a família de transportadores de aminoácido ATF (Amino acid transporter family), são mediadores da absorção e realizam o co-transporte da auxina desprotonada e de prótons (H<sup>+</sup>) através da membrana (Swarup & Péret, 2012). O transportador AUX1 apresenta maior afinidade com o 2,4-D em relação aos outros herbicidas auxínicos (Hoyerova *et al.*, 2018). Em *A. thaliana* a perda de função do gene *AUX1* conduz a plantas com reduzida translocação e maior insensibilidade ao herbicida 2,4-D (Pickett *et al.*, 1990; Roux & Reboud, 2005; Yu & Wen, 2013). Estudos com os inibidores de transportadores ABC (rutina, orthovanadato, NPA - ácido naftilftalâmico, valspodar e verapamil), PIN (TIBA - ácido triiodobenzóico) e a poliamina putrescina podem contribuir para investigação de alteração na atividade dessas proteínas, relacionada ao mecanismo de resistência aos herbicidas auxínicos (Goggin *et al.*, 2016; Queiroz *et al.*, 2022).

### 2.3.1.2 Receptores de auxinas

Os níveis de auxina na planta são percebidos por receptores ABP1 (Auxin Binding Protein 1) e pelo complexo receptor SCFTIR1/AFB (Transport inhibitor response 1/ Auxin Signaling F-Box protein), que ativam as respostas celulares (Grones *et al.*, 2015). Inicialmente, acreditava-se que o ABP1 estaria envolvido em respostas não transcricionais rápidas a auxinas, atuando como receptor extracelular (Grones *et al.*, 2015). Entretanto, estudos recentes indicam que o ABP1 não seria exatamente um receptor de auxinas (Kubes & Napier, 2019). O complexo SCFTIR1/AFB em conjunto com AUX/IAAs atua na regulação da expressão de genes de resposta a auxinas (Mockaitis & Estelle, 2008; Leyser, 2018). O receptor de auxina TIR1 juntamente com AFB faz parte de um complexo de ubiquitinação TIR1/AFBSCF do tipo ubiquitina proteína ligase E3, que atua na transferência de ubiquitina através dos processos de ativação e conjugação enzimática. Esse processo conduz a marcação de moléculas para subsequente degradação por um complexo de proteassoma 26S (Leyser, 2018; Niemeyer *et al.*, 2020).

As auxinas, assim como o herbicida 2,4-D, atuam como uma cola molecular que liga o complexo TIR1/AFBSCF com o repressor AUX/IAA, o que conduz a degradação do repressor e liberação de fatores de resposta a auxina (ARFs). A cascata de liberação de ARFs conduz a ativação de genes induzidos por auxinas e aos sintomas de epinastia observados em plantas expostas a herbicidas auxínicos (Grossmann, 2010; Song, 2014). Assim, uma mutação no gene que codifica a subunidade TIR1 desse complexo poderia reduzir a interação com o 2,4-D e inibir a ativação de genes de resposta a auxinas (Gleason *et al.*, 2011; Busi *et al.*, 2018). Alterações no co-receptor de auxinas AUX/IAA foram relacionadas a resistência a dicamba e 2,4-D em populações de *K. scoparia* e *S. orientale*, respectivamente (LeClere *et al.*, 2018; Figueiredo *et al.*, 2022). Alterações nesse gene afetam a formação do complexo entre receptor TIR1/AFB, herbicida e AUX/IAA, impedindo a degradação do co-receptor e a consequente ativação transcricional dos genes responsivos as auxinas que promovem a morte da planta (LeClere *et al.*, 2018).

### 2.3.1.3 Enzimas de detoxificação

A resistência a herbicidas em plantas daninhas pode ser conferida pelo aumento da atividade detoxificante de enzimas, que transformam o herbicida em compostos menos tóxicos para as plantas. As principais enzimas envolvidas nesse processo são citocromo P450 monooxigenases (cytP450) e glutathione S transferase (GST). Em algumas espécies as enzimas glicosiltransferases (GTs), aril acilamidase, aldo-ceto redutase e b-cianoalanina sintase também atuam na metabolização de determinados herbicidas (Powles & Yu, 2010; Gaines *et al.*, 2020). Posteriormente, esses metabólitos degradados e conjugados são transportados e compartimentalizados no vacúolo, por meio da ação de transportadores ABC de tonoplasto (Yuan *et al.*, 2007) ou são depositados na parede celular e associam-se aos seus componentes (Skidmore, 2000; Gaines *et al.*, 2020).

As enzimas cytP450 são capazes de metabolizar simultaneamente herbicidas de diferentes modos de ação, inclusive herbicidas nunca aplicados anteriormente na população de plantas (Powles & Yu, 2010). A detecção da ocorrência de metabolização de herbicidas pelas enzimas cytP450 pode ser realizada através do uso de inibidores, como o inseticida organofosforado malathion (Yasuor *et al.*, 2009). A enzima GST é responsável pela tolerância de culturas e resistência de plantas daninhas a herbicidas (Powles & Yu, 2010). Essa enzima está relacionada principalmente a conjugação de glutathione, atrazina e herbicidas inibidores da ACCase (Acetil-CoA carboxilase) em

várias espécies gramíneas (Kreuz *et al.*, 1996; Powles & Yu, 2010). A detecção da resistência por essas enzimas pode ser confirmada pelo uso do inibidor GST 4-chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-Cl) que atua como mimetizador de glutathione e se liga ao sítio de conjugação da enzima GST, inibindo a ligação com o herbicida (Cummins *et al.*, 2013). Em *C. sumatrensis* resistente ao 2,4-D por rápida necrose não foi constatado efeito dos inibidores de enzimas de detoxificação, malathion e NBD-Cl, na reversão dos sintomas da rápida necrose (Queiroz *et al.*, 2022).

### 2.3.2 Sequenciamento de RNA (RNA Seq)

O sequenciamento de RNA (RNA Seq) para caracterização do transcriptoma das plantas é importante na investigação de mecanismos de resistência pela capacidade de revelar a expressão de genes e fornecer comparações do transcriptoma inteiro entre plantas suscetíveis e resistentes aos herbicidas, inclusive de espécies não modelo (Yuan *et al.*, 2010; Gaines *et al.*, 2014; Duhoux *et al.*, 2017). Os dados obtidos podem indicar as alterações na expressão de genes candidatos, relacionadas à redução da sensibilidade da planta ao herbicida (Giacomini *et al.*, 2018). A expressão de um gene em resposta a um estímulo corresponde a um curto intervalo de tempo no organismo. Portanto, o momento e as condições de amostragem do tecido vegetal a ser sequenciado devem ser bem estabelecidos para representar com precisão o transcriptoma do organismo sob a condição experimental amostrada para efetiva identificação dos genes candidatos (Matsuda, 2021). Parte do desafio é a obtenção da correta janela de amostragem após o tratamento das plantas com o herbicida para facilitar a identificação de genes relacionados com a resistência. Períodos muito abrangentes de amostragem capturam a expressão de genes relacionados à resposta de estresse da planta, desencadeado em decorrência do distúrbio inicial causado pelo herbicida (Giacomini *et al.*, 2018).

A ocorrência localizada dos sintomas de rápida necrose na planta e a variação de resposta em função das características do ambiente (Queiroz *et al.*, 2020; Leal *et al.*, 2022) tornam fundamental a padronização das condições de amostragem do material com resultados prévios que confirmem a evolução da sintomatologia na determinada condição. A partir da amostragem representativa há maior possibilidade de que a expressão dos genes candidatos seja abrangida pelo período de coleta definido.

## 2.4 Referências

ANDERSEN, M. C. Diaspore morphology and seed dispersal in several wind-dispersed asteraceae. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 80, p. 487-492, 1993.

AVIV, D. H. Runaway cell death, but not basal disease resistance, in *lsd1* is SA- and NIM1/NPR1-dependent. **The Plant Journal**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 381-391, 2002.

BRABHAM, C. B.; GERBER, C. K.; JOHNSON, W. G. Fate of glyphosate-resistant giant ragweed (*Ambrosia trifida*) in the presence and absence of glyphosate. **Weed Science**, Champaign, v. 59, n. 4, p. 506-511, 2011.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio. Coordenação Geral. **Parecer Técnico n. 5500/2017**. Brasília, DF: MCTIC, 2017a. Disponível em: <http://ctnbio.mctic.gov.br/documents/566529/2257309/Parecer+T%C3%A9cnico+n%C2%BA%205500+-+2017/5801314b-56a2-4883-84c8-0bec8bf0c8e6?version=1.0>. Acesso em: 25 mar. 2022.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio. Coordenação Geral. **Parecer Técnico n. 5330/2017**. Liberação comercial de organismo geneticamente modificado. Brasília, DF: MCTIC, 2017b. Disponível em: <http://ctnbio.mctic.gov.br/documents/566529/2174567/Parecer+T%C3%A9cnico+n%C2%BA%205330+-+2017/44ee559a-2996-4345-886c-ee4f6255c021>. Acesso em: 25 mar. 2022

BUSI, R. *et al.* Weed resistance to synthetic auxin herbicides. **Pest Management Science**, Malden, v. 74, n. 10, p. 2265-2276, 2018.

CHO, M.; CHO, H. T. The function of ABCB transporters in auxin transport. **Plant Signaling and Behavior**, Austin, v. 8, n. 2, p. 6-9, 2013.

CHRISTOFFOLETI, P. J. *et al.* Auxinic herbicides, mechanisms of action, and weed resistance: a look into recent plant science advances. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 72, n. 4, p. 356-362, 2015.

COBB, A. H.; READE, J. P. H.; ADAMS, H. **Herbicides and plant physiology**. 2nd ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010.

CUMMINS, I. *et al.* Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 110, n. 15, p. 5812-5817, 2013.

DAN, H. A. *et al.* Histórico da infestação de Buva resistente a herbicidas no mundo e no Brasil. In: CONSTANTIN, J. *et al.* (ed.). **Buva: fundamentos e recomendações para manejo**. Curitiba: Omnipax, 2013. cap. 2, p. 5-9.

DAUER, J. T.; MORTENSEN, D. A.; VANGESSEL, M. J. Temporal and spatial dynamics of long-distance *Conyza canadensis* seed dispersal. **Journal of Applied**



**Ecology**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 105-114, 2006.

DUHOUX, A. *et al.* Transcriptional markers enable identification of rye-grass (*Lolium* sp.) plants with non-target-site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase. **Plant Science**, Shannon, v. 257, p. 22-36, 2017.

EPP, J. B. *et al.* The discovery of Arylex<sup>TM</sup> active and Rinskor<sup>TM</sup> active: two novel auxin herbicides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 24, p. 362-371, 2016.

FIGUEIREDO, M. R. A. *et al.* 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**, Washington, DC, v. 119, n. 9, [art.] e2105819119, 2022.

FIGUEIREDO, M. R. *et al.* Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid contributes to resistance in a common waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) population. **Pest Management Science**, Malden, v. 74, n. 10, p. 2356-2362, 2018.

FRANKTON, C.; MULLIGAN, G. A. **Weeds of Canada**. Toronto: NC Press, 1987.

FUERST, E. P. Paraquat resistance in *Conyza*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 77, p. 984-989, 1985.

GAINES, T. A. *et al.* RNA-Seq transcriptome analysis to identify genes involved in metabolism-based diclofop resistance in *Lolium rigidum*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 78, p. 865-876, 2014.

GAINES, T. A. The quick and the dead: a new model for the essential role of ABA accumulation in synthetic auxin herbicide mode of action. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 71, n. 12, p. 3383-3385, 2020.

GAZZIERO, D. L. P. *et al.* Interferência da Buva em áreas cultivadas com soja. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27., 2010, Ribeirão Preto. **Anais**. Londrina: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2010. p. 1555-1558.

GEISLER, M. M. A retro-perspective on auxin transport. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 12, [art.] 756968, [p. 1-12], 2021.

GIACOMINI, D. A. *et al.* Optimizing RNA-seq studies to investigate herbicide resistance. **Pest Management Science**, Malden, v. 74, p. 2260-2264, 2018.

GLEASON, C.; FOLEY, C.; SINGH, K. B. Mutant analysis in *Arabidopsis* provides insight into the molecular mode of action of the auxinic herbicide dicamba. **PLOS One**, San Francisco, v. 6, n. 3, [art.] 17245, [p. 1-12], 2011.

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**, Oxford, v. 67, n. 11, p. 3223-3235, 2016.

GOGGIN, D. E. *et al.* Plasma membrane receptor-like kinases and transporters are associated with 2,4-D resistance in wild radish. **Annals of Botany**, Oxford, v. 125, p. 821-832, 2020.

GREEN, T. D. **The ecology of fleabane (*Conyza spp.*)**. 2010. 183 f. Thesis (Doctoral) - School of Environmental and Rural Science, Faculty of Arts and Sciences, University of New England, Biddeford, 2010.

GRONES, P. *et al.* Auxin-binding pocket of ABP1 is crucial for its gain-of-function cellular and developmental roles. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, n. 16, p. 5055-5065, 2015.

GROSSMANN, K. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. **Pest Management Science**, Malden, v. 66, n. 2, p. 113-120, 2010.

HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. **Plant Molecular Biology**, Waltham, v. 49, n. 3/4, p. 373-385, 2002.

HAO, J. H. *et al.* Reproductive traits associated with invasiveness in *Conyza sumatrensis*. **Journal of Systematics and Evolution**, Beijing, v. 47, n. 3, p. 245-254, 2009.

HARRE, N. T.; YOUNG, J. M.; YOUNG, B. G. Environmental factors moderate glyphosate induced antagonism of POST herbicides on the rapid response biotype of glyphosate resistant giant ragweed (*Ambrosia trifida*). **Weed Science**, Champaign, v. 66, p. 301-309, 2018.

HEAP, I. **The international survey of herbicide resistant weeds**. [Database]. San Diego: WSSA, 2022 Disponível em: <http://www.weedscience.org>. Acesso em: 2 abr. 2022.

HILTON, H. W. Herbicide tolerant strains of weeds. **Hawaiian Sugar Planters Association Annual Report**, Honolulu, p. 69-72, 1957.

HOYEROVA, K. *et al.* Auxin molecular field maps define AUX1 selectivity: many auxin herbicides are not substrates. **New Phytologist**, London, v. 217, n. 4, p. 1625-1639, 2018.

ITO, H.; GRAY, W. M. A Gain-of-Function mutation in the *Arabidopsis* pleiotropic drug resistance transporter PDR9 confers resistance to auxinic herbicides. **Plant Physiology**, Rockville, v. 142, p. 63-74, 2006.

JEFFERY, T. **Investigation into the molecular and biochemical mechanisms of resistance in two biotypes of glyphosate resistant giant ragweed**. 2014. 77 f. Thesis (Degree of Master of Science) - The University of Guelph, Guelph, ON, 2014.

- KASPARY, T. E. *et al.* Growth, phenology, and seed viability between glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible hairy fleabane. **Bragantia**, Campinas, v. 76, n. 1, p. 92-101, 2017.
- KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2. ed. São Paulo: BASF, 1999.
- KREUZ, K.; TOMMASINI, R.; MARTINOIA, E. Old enzymes for a new job (Herbicide Detoxification in Plants). **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, n. 2, p. 349-353, 1996.
- KUBES, M.; NAPIER, R. Non-canonical auxin signalling: fast and curious. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 70, n. 10, p. 2609-2614, 2019.
- LAZAROTO, C. A.; FLECK, N. G.; VIDAL, R. A. Biologia e ecofisiologia de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 852-860, 2008.
- LEAL, J. F. L. *et al.* Rapid photosynthetic and physiological response of 2,4-D-resistant Sumatran fleabane (*Conyza sumatrensis*) to 2,4-D as a survival strategy. **Weed Science**, Champaign, v. 70, n. 3, p. 298-308, 2022.
- LECLERE, S. *et al.* 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**, Washington, DC, v. 115, p. 2911-2920, 2018.
- LEHOCZKI, E. *et al.* Resistance to triazine herbicides in horseweed (*Conyza canadensis*). **Weed Science**, Champaign, v. 32, p. 669-674, 1984.
- LEYSER, O. Auxin signaling. **Plant Physiology**, Rockville, v. 176, p. 465-479, 2018.
- MATSUDA, T. Importance of experimental information (metadata) for archived sequence data: case of specific gene bias due to lag time between sample harvest and RNA protection in RNA sequencing. **PeerJ**, Corte Madera, v. 25, n. 9, [art.] e11875, 2021.
- MICHNIEWICZ, M.; BREWER, P. B.; FRIML, J. Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. **Arabidopsis Book**, Rockville, v. 5, [art.] e0108, p. 2-28, 2007.
- MOCKAITIS, K.; ESTELLE, M. Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, San Mateo, v. 24, p. 55-80, 2008.
- MORETTI, M. L. *et al.* Glyphosate resistance in *Ambrosia trifida*: Part 2. Rapid response physiology and non-target-site resistance. **Pest Management Science**, Malden, n. 74, p. 1079-1088, 2018.
- NANDULA, V. K. *et al.* Factors affecting germination of horseweed (*Conyza canadensis*). **Weed Science**, Champaign, v. 54, p. 898-902, 2006.

NIEMEYER, M. *et al.* Flexibility of intrinsically disordered degrons in AUX/IAA proteins reinforces auxin co-receptor assemblies. **Nature Communications**, London, v. 11, [art.] 2277, [p. 1-18], 2020.

OLIVEIRA NETO, A. M. *et al.* Interferência de buva em sistemas de cultivo. *In: CONSTANTIN, J. et al. (ed.). Buva: fundamentos e recomendações para manejo.* Curitiba: Omnipax, 2013. cap. 4, p. 27-31.

PADMANABHAN, K. R. *et al.* Preliminary investigation of glyphosate resistance mechanism in giant ragweed using transcriptome analysis. **F1000Research**, London, v. 5, [art.] 1354, [p. 1-10], 2016.

PETERSON, M. A. *et al.* 2,4-D past, present, and future: a review. **Weed Technology**, Champaign, v. 30, p. 303-345, 2016.

PICKETT, F. B.; WILSON, A. K.; ESTELLE, M. The aux1 mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 94, n. 3, p. 1462-1466, 1990.

PINHO, C. F. *et al.* First evidence of multiple resistance of Sumatran Fleabane (*Conyza sumatrensis* (Retz.) E. Walker) to five- mode-of-action herbicides. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v. 13, n. 13, p. 1688-1697, 2019.

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

QUEIROZ, A. R. S. **Caracterização da resistência ao herbicida 2,4-D em *Conyza sumatrensis* associada à rápida necrose.** 2019. Tese (Doutorado) - Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

QUEIROZ, A. R. S. *et al.* Rapid necrosis: a novel plant resistance mechanism to 2,4-D. **Weed Science**, Champaign, v. 68, n. 1, p. 6-18, 2020.

QUEIROZ, A. R. S. *et al.* Rapid necrosis II: physiological and molecular analysis of 2,4-D resistance in Sumatran fleabane (*Conyza sumatrensis*). **Weed Science**, Champaign, v. 70, n. 1, p. 36-45, 2022.

REY-CABALLERO, J. *et al.* Unravelling the resistance mechanisms to 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) in corn poppy (*Papaver rhoeas*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 133, p. 67-72, 2016.

ROUX, F.; REBOUD, X. Is the cost of herbicide resistance expressed in the breakdown of the relationships between characters? A case study using synthetic-auxin-resistant *Arabidopsis thaliana* mutants. **Genetics Research**, Cambridge, v. 85, n. 2, p. 101-110, 2005.

SANTOS, G. *et al.* Aspectos da biologia e da germinação da Buva. *In: Buva: fundamentos e recomendações para manejo.* Curitiba: Omnipax, 2013. p. 11-26.

SANTOS, G. *et al.* Multiple resistance of *Conyza sumatrensis* to Chlorimuron ethyl and to Glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 32, n. 2, p. 409-416, 2014.

SHAALTIEL, Y.; GRESSEL, J. Kinetic analysis of resistance to paraquat in *Conyza*: evidence that paraquat transiently inhibits leaf chloroplast reactions in resistant plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, n. 4, p. 869-71, 1987.

SHIELDS, E. J. *et al.* Horseweed (*Conyza canadensis*) seed collected in the planetary boundary layer. **Weed Science**, Champaign, v. 54, p. 1063-1067, 2006.

SKIDMORE, M. W. Bound residues arising from the use of agrochemicals on plants. *In*: ROBERTS, T. (ed.) **Metabolism of agrochemicals in plants**, Chichester: Wiley, 2000. p. 155-178.

SOARES, D. J. *et al.* Control of glyphosate resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) with dicamba and 2,4-D. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 30, n. 2, p. 401-406, 2012.

SONG, Y. Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. **Journal of Integrative Plant Biology**, Hoboken, v. 56, n. 2, p. 106-113, 2014.

STECKEL, L. E.; CRAIG, C.; HAYES, R. M. Glyphosate-resistant Horseweed (*Conyza canadensis*) control with glufosinate prior to planting no-till cotton (*Gossypium hirsutum*). **Weed Technology**, Champaign, v. 20, p. 1047-1051, 2006.

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

SWARUP, R.; PÉRET, B. AUX/LAX family of auxin influx carriers - an overview. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 3, [art.] 225, [p. 1-11], 2012.

SWITZER, C. M. The existence of 2,4-D-resistant strains of wild carrot. **Proceedings of the Northeastern Weed Control Conference**, Washington, DC, v. 11, p. 315-318, 1957.

TAN, X. *et al.* Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. **Nature**, London, v. 446, p. 640-645, 2007.

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

TODD, O. E. *et al.* Synthetic auxin herbicides: finding the lock and key to weed resistance. **Plant Science**, Shannon, v. 300, [art.] 110631, [p. 1-8], 2020.

TORRA, J. *et al.* Cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance to imazamox and 2,4-D in *Papaver rhoeas*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v.

160, p. 51-61, 2021.

TREMMELE, C. D.; PETERSON, K. M. Competitive subordination of a piedmont old field successional dominant by an introduced species. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 70, n. 8, p. 1125-1132, 1983.

TREZZI, M. M. *et al.* Impact of *Conyza bonariensis* density and establishment period on soybean grain yield, yield components and economic threshold. **Weed Research**, Oxford, v. 55, p. 34-41, 2014.

VAN HORN, C. R. *et al.* Glyphosate resistance in *Ambrosia trifida*: Part 1. Novel rapid cell death response to glyphosate. **Pest Management Science**, Malden, v. 74, p. 1071-1078, 2018.

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

VARGAS, L. *et al.* *Conyza bonariensis* biotypes resistant to the glyphosate in southern Brazil. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 25, n. 3, p. 573-578, 2007.

VIDAL, R. A. *et al.* Impacto da temperatura, irradiância e profundidade das sementes na emergência e germinação de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* resistentes ao glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 25, n. 2, p. 309-315, 2007.

VILLALOBOS, L. I. A. C. *et al.* A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. **Nature Chemical Biology**, London, v. 8, n. 5, p. 477-485, 2012.

WU, H. *et al.* Germination, persistence, and emergence of flaxleaf fleabane (*Conyza bonariensis* [L.] Cronquist). **Weed Biology and Management**, Carlton, v. 7, n. 3, p. 192-199, 2007.

WU, X. J. *et al.* Regulation of auxin accumulation and perception at different developmental stages in carrot. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 80, p. 243-251, 2016.

XU, Y. *et al.* Seed germination ecology of *Conyza sumatrensis* populations stemming from different habitats and implications for management. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 16, n. 12, [art.] e0260674, 2021.

YASUOR, H. *et al.* Mechanism of resistance to penoxsulam in late watergrass [*Echinochloa phyllopogon* (Stapf) Koss.]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 57, p. 3653-3660, 2009.

YU, J.; WEN, C. K. *Arabidopsis* aux1rcr1 mutation alters auxin resistant targeting and prevents expression of the auxin reporter DR5:GUS in the root apex. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, p. 921-933, 2013.

YUAN, J. S. *et al.* Functional genomics analysis of horseweed (*Conyza canadensis*) with special reference to the evolution of non-target-site glyphosate resistance. **Weed**

**Science**, Champaign, v. 58, n. 2, p. 109-117, 2010.

YUAN, J. S.; TRANEL, P. J.; NEAL, S. J. Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 12, n. 1, p. 6-13, 2007.

ZAZÍMALOVÁ, E. *et al.* Auxin transporters-why so many? **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Cold Spring Harbor, v. 2, [art.] a001552, 2010.

### **3 CAPÍTULO 1**

**Efeito de inibidores metabólicos no fenótipo de rápida necrose em biótipo de buva  
resistente ao herbicida auxínico 2,4-D**



## **EFEITO DE INIBIDORES METABÓLICOS NO FENÓTIPO DE RÁPIDA NECROSE EM BIÓTIPO DE BUVA RESISTENTE AO HERBICIDA AUXÍNICO 2,4-D**

### **RESUMO**

A resistência ao herbicida auxínico 2,4-D em buva está relacionada com a ocorrência de sintomas atípicos de rápida necrose foliar e de estresse oxidativo logo após o tratamento. O mecanismo de resistência ainda é desconhecido, porém estudos anteriores indicam que alterações no transporte do herbicida, e a indução da resposta a patógenos e estresses abióticos podem estar relacionados à resistência. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de inibidores metabólicos, aplicados através de diferentes metodologias, na reversão dos sintomas de rápida necrose e do acúmulo de peróxido de hidrogênio após a aplicação de 2,4-D como forma de entendimento do mecanismo de resistência em *Conyza sumatrensis*. A aplicação dos inibidores relacionados a detoxificação malathion e NBD-Cl, ao transporte de auxinas rutina, TIBA e NPA e ao estresse oxidativo imidazole, fluoridone, DTT e DDC através da incubação de discos foliares, aspersão foliar e hidroponia não reverteu os sintomas relacionados a resistência no biótipo MARPR9-RN e também não promoveu a ocorrência desses sintomas no biótipo suscetível LONDS4-S. Contudo, os inibidores orthovanadato e azida sódica avaliados através da incubação de discos foliares previamente ao 2,4-D (9,09 mM), promoveram redução do acúmulo de peróxido de hidrogênio no biótipo resistente. A aspersão foliar prévia de orthovanadato reduziu a necrose foliar das plantas resistentes em relação à aspersão isolada de 2,4-D (804 g ha<sup>-1</sup>) na avaliação de 1 dia após o tratamento (DAT). Aos 28 DAT orthovanadato e verapamil aumentaram a injúria nas plantas resistentes, indicando aumento do efeito do herbicida no controle do biótipo resistente. Verapamil e orthovanadato inibem a ação de transportadores do tipo ABC relacionados ao transporte de auxinas. Na avaliação dos inibidores aplicados em hidroponia, novamente orthovanadato e verapamil, e também putrescina atrasaram o início da ocorrência e reduziram os sintomas de necrose em comparação com o tratamento isolado do herbicida através da aplicação na solução nutritiva ou por aspersão foliar. Complementar a esses estudos foi realizada a avaliação de inibidores do fotossistema II aplicados em solução nutritiva no fenótipo de rápida necrose. Atrazina e diuron atenuaram os sintomas nas plantas resistentes quando aplicados previamente ao 2,4-D (2000µM). Esse resultado foi confirmado através da avaliação de plantas mantidas na ausência e presença de luz antes e após a aplicação de 2,4-D (4,02 g L<sup>-1</sup>). Alterações na fotossíntese das plantas resistentes afetaram o tempo e a intensidade de resposta ao herbicida 2,4-D, mas não condicionaram a ocorrência da resistência. O efeito dos inibidores de transportadores ABC orthovanadato e verapamil foi consistente na redução parcial dos sintomas ou no atraso da ocorrência de rápida necrose nos diferentes experimentos, e indica que alterações no transporte de 2,4-D por transportadores ABC podem estar relacionadas com a resistência associada a rápida necrose em buva.

### 3.1 Introdução

Os herbicidas auxínicos são usados para o controle seletivo de plantas daninhas dicotiledôneas desde o início da comercialização do 2,4-D em 1945 (Peterson *et al.*, 2016). Desde então, já foram registrados comercialmente 16 diferentes ingredientes ativos pertencentes a esse mecanismo de ação. A molécula dos herbicidas auxínicos é composta por um anel aromático e um radical ácido carboxílico, semelhante à auxina natural ácido indol-3-acético (AIA), e assim atuam mimetizando os efeitos de concentrações excessivas desse hormônio vegetal (Busi *et al.*, 2018). O mecanismo de ação dos herbicidas auxínicos está relacionado a degradação de reguladores de transcrição de auxinas da família AUX/IAA devido a ação desses herbicidas na interação entre AUX/IAA e o receptor de auxina TIR1/AFB (Hagen & Guilfoyle, 2002; Tan *et al.*, 2007; Villalobos *et al.*, 2012; Kubes & Napier, 2019). No entanto, ainda existem lacunas quanto ao modo de ação preciso desses herbicidas, especificamente sobre a sequência dos eventos e dos processos que levam a planta à morte (Gaines, 2020).

Quando a planta está com a concentração de auxina em equilíbrio as proteínas repressoras da família AUX/IAA se ligam aos fatores de resposta à auxina (ARFs) impedindo sua associação aos genes responsivos a esse hormônio que levariam a morte da planta (Grossmann, 2010). Entretanto, após a aplicação de herbicidas auxínicos, a concentração do hormônio aumenta nas células da planta e desregula a expressão dos genes responsivos à auxina através da ligação de AUX/IAA ao receptor de auxina TIR1/AFB por intermédio do herbicida, resultando na ubiquitinação e destruição de AUX/IAA. Assim, os ARFs são rapidamente transcritos e iniciam a indução dos genes responsivos à auxina (Grossmann, 2010; Gaines, 2020). Em consequência, a planta desenvolve os sintomas característicos de epinastia foliar, espessamento de caules e raízes, clorose e necrose das folhas, o que resulta na morte da planta (Song, 2014). Recentemente, foi proposto que *9-CIS-EPOXICAROTENO DEOXIGENASE (NCED)* é o principal gene responsivo à auxina (McCauley *et al.*, 2020). A rápida regulação positiva desse gene promove a síntese e o acúmulo prolongado de ácido abscísico (ABA), seguidos de repressão geral da transcrição relacionada à fotossíntese e senescência foliar. Assim, a morte das plantas em decorrência da aplicação de herbicidas auxínicos seria devido à interrupção de fotossíntese e à desregulação de seu crescimento (McCauley *et al.*, 2020). Contudo, ainda é necessário confirmar a função de *NCED* no modo de ação

desses herbicidas avaliando se o silenciamento desse gene confere resistência aos herbicidas auxínicos em plantas modelo (Gaines, 2020).

O mecanismo de resistência a herbicidas auxínicos ainda é desconhecido para maioria das espécies de plantas daninhas, em parte devido ao não conhecimento completo do modo de ação destes herbicidas. Apenas alguns dos casos de resistência a herbicidas auxínicos tiveram o mecanismo caracterizado e, em geral, sua regulação molecular ainda é desconhecida (Todd *et al.*, 2020). Estudos recentes caracterizaram mutações em receptores que causam insensibilidade às auxinas, metabolização e restrição de translocação das auxinas como processos envolvendo a resistência a herbicidas auxínicos (Goggin *et al.*, 2016; LeClere *et al.*, 2018; Figueiredo *et al.*, 2022). Alterações no co-receptor de auxinas AUX/IAA foram relacionadas a resistência a dicamba e 2,4-D em populações de *Kochia scoparia* e *Sisymbrium orientale*, respectivamente (LeClere *et al.*, 2018; Figueiredo *et al.*, 2022). Em outro estudo, a atividade de enzimas citocromo P450 monooxigenases (cytP450) na metabolização do herbicida 2,4-D foi identificada como principal processo envolvido na sobrevivência de plantas *Papaver rhoeas* com resistência múltipla a herbicidas auxínicos e inibidores da ALS (Torra *et al.*, 2021). O mecanismo de translocação reduzida do herbicida 2,4-D foi encontrado em plantas de *Raphanus raphanistrum* resistentes devido a alterações na atividade de transportadores ABCB na membrana plasmática (Goggin *et al.*, 2016).

Um novo fenótipo associado a ocorrência de rápida necrose dos tecidos foliares foi observado em plantas de *Ambrosia trifida* resistentes ao glifosato (Brabham *et al.*, 2011) e de *Conyza sumatrensis* resistentes ao herbicida 2,4-D (Queiroz *et al.*, 2020). A regulação molecular relacionada à ocorrência da resistência em ambas as espécies ainda é desconhecida. Contudo, análises fisiológicas e moleculares têm revelado avanços no conhecimento dessa resistência. Em *C. sumatrensis* a resistência relacionada com a rápida necrose foi identificada apenas para os herbicidas do grupo dos ácidos fenoxicarboxílicos, 2,4-D e MCPA e não para herbicidas dos grupos dos ácidos benzoicos, dicamba, e ácidos piridinocarboxílicos, florpyrauxifen-benzyl, fluroxypyr, halauxifen-methyl, picloram e triclopyr (Queiroz *et al.*, 2020). Os sintomas de 2,4-D foram observados somente em folhas maduras, sem ocorrência em meristemas e folhas jovens. A produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), associada a resistência, foi observada 15 minutos após a aplicação do 2,4-D e os sintomas visuais de rápida necrose ocorreram 2 h após o tratamento (Queiroz *et al.*, 2020). A resposta de rápida necrose nas plantas de *C. sumatrensis* resistentes é influenciada pelas condições ambientais. Nas condições de baixa

luminosidade ( $29 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e baixa temperatura ( $12^\circ\text{C}$ ) a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi reduzida nas plantas resistentes e ocorreu atraso no início dos sintomas em comparação as condições de maior intensidade luminosa ( $848 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e temperatura ( $30^\circ\text{C}$ ) (Queiroz, 2019; Queiroz *et al.*, 2020). Contudo, a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  não é dependente da presença de luz nessa espécie e o sintoma ocorre mesmo na condição de escuro (Leal *et al.*, 2022).

Estudos de expressão de genes candidatos identificaram que a aplicação de 2,4-D no biótipo resistente de *C. sumatrensis* aumentou a expressão do gene de resposta a patógenos e estresses abióticos *LSD1\_3* (*LESION SIMULATING DISEASE 1*) (Queiroz *et al.*, 2022). Entretanto, a expressão dos genes *ABCM10* (*ABC-C FAMILY MRP10* - gene transportador ABCD), *TIR1\_1* (*TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1* - gene receptor de auxinas), *CALS1* (*CALLOSE SYNTHASE 1* - biossíntese de calose) e *CAT4* (*CATIONIC AMINO ACID TRANSPORTER 4* - gene transportador de aminoácidos) foi rapidamente reduzida nas plantas resistentes tratadas com 2,4-D (Queiroz *et al.*, 2022). Em outro estudo foi identificado que a atividade basal das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) foi superior nas plantas de *C. sumatrensis* resistentes em comparação com as suscetíveis (Leal *et al.*, 2022). Contudo, a atividade de todas as enzimas não diferiu entre plantas resistentes não tratadas e tratadas com o herbicida. Também foi identificada redução no índice de desempenho da cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos em biótipo resistente 1 h e 4 h após a aplicação do herbicida. No biótipo suscetível essas alterações metabólicas foram detectadas somente após 4 h da aplicação (Leal *et al.*, 2022).

O estudo do mecanismo de resistência em *C. sumatrensis* também foi realizado com inibidores metabólicos (Queiroz *et al.*, 2022). Compostos inibidores de enzimas relacionadas ao transporte e detoxificação do herbicida e ao estresse oxidativo foram avaliados. Ao avaliar o efeito desses inibidores no fenótipo de rápida necrose e na produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de *C. sumatrensis* foi observado que inibidores de transportadores ABC de auxinas, e de enzimas envolvidas na detoxificação como cytP450 e glutathione-S-transferase (GST) não reverteram o fenótipo de rápida necrose nas plantas resistentes e não causaram esses sintomas nas plantas suscetíveis. No entanto, os inibidores de transportadores orthovanadato e azida sódica reduziram parcialmente o estresse oxidativo de discos foliares do biótipo resistente, em comparação com o tratamento do herbicida isolado (Queiroz *et al.*, 2022).

O inibidor orthovanadato pode estar relacionado à redução do transporte de auxinas, pois atua na inibição de transportadores ABC (Geisler & Murphy, 2005). A azida sódica também pode estar associada a redução do transporte de auxina, pois como inibidor da ATPase pode limitar a energia disponível para a ação dos transportadores ABC (Petersson *et al.*, 2009). Ao reduzir o efluxo de 2,4-D para fora da célula, os inibidores estariam limitando a translocação e o número de células afetadas pelo herbicida e consequentemente restringindo o estresse oxidativo e a área danificada pela rápida necrose. Os resultados desse estudo sugerem que o mecanismo de resistência por rápida necrose não envolve a detoxificação do 2,4-D por enzimas cytP450 e GST, mas pode estar relacionada a alterações no transporte de auxinas (Queiroz *et al.*, 2022). Esses inibidores não apresentaram efeito quando aplicados em aspersão e outros inibidores de enzimas transportadoras avaliados, rutina e verapamil não promoveram a redução do estresse oxidativo nas plantas resistentes (Queiroz *et al.*, 2022). Estes resultados podem apresentar limitações devido a metodologia de avaliação utilizada, especialmente em relação as consequências para a absorção dos inibidores pelas plantas devido as características do método de aplicação, concentração do inibidor e intervalo de aplicação em relação ao tratamento com o herbicida. Assim, estudos complementares que explorem esses fatores com maior amplitude são importantes na caracterização do mecanismo de resistência ao 2,4-D associado à rápida necrose.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de inibidores metabólicos aplicados através de diferentes metodologias na reversão dos sintomas relacionados à rápida necrose causada pelo herbicida 2,4-D como forma de entendimento do mecanismo de resistência em *C. sumatrensis*.

### **3.2 Material e Métodos**

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação climatizada e em câmaras de crescimento do Departamento de Plantas de Lavoura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em Porto Alegre/RS.

#### **3.2.1 Material vegetal e condições de crescimento**

Os experimentos foram realizados com os biótipos de *C. sumatrensis* LONDS4-S, suscetível ao herbicida auxínico 2,4-D, e MARPR9-RN caracterizado em estudo anterior

como resistente a 2,4-D devido a ocorrência de rápida necrose (Queiroz *et al.*, 2020). A semeadura dos biótipos foi realizada em bandejas plásticas com dimensão de 15 cm (C) x 15 cm (L) x 10 cm (A), preenchidas com substrato comercial composto por turfa e casca de arroz torrefada (Carolina Soil<sup>®</sup>). As bandejas foram mantidas em casa de vegetação climatizada com temperatura média de  $28^{\circ}\text{C} \pm 3$  e irrigação diária para promover a germinação das sementes. Quando as plântulas estavam no estágio de quatro a cinco folhas imaturas foram transplantadas para vasos plásticos individuais com capacidade de 200 mL. Os vasos foram previamente preenchidos com substrato na proporção 1:1, solo (Argissolo Vermelho) : substrato comercial, e 5 g de NPK (14-16-18) para cada 1 kg de substrato. Os vasos foram mantidos em bandejas plásticas com lâmina d'água de aproximadamente 2 cm. Nos experimentos realizados em hidroponia, plântulas no estágio de quatro a cinco folhas imaturas foram transferidas para vasos com capacidade de 1 L, mantidas sobre suporte de polietileno expandido. Os vasos foram previamente preenchidos com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (Hoagland & Arnon, 1950). O pH da solução nutritiva foi mantido em 5,6. Cada unidade experimental recebeu oxigenação constante e individual da solução com bomba de ar. A solução nutritiva foi renovada a cada três dias. As plantas foram conduzidas em casa de vegetação climatizada e câmara de crescimento (BDR16 Conviron) com condições de temperatura e fotoperíodo conforme descrito para cada experimento. Todos os experimentos foram realizados duas vezes e conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com quatro repetições.

### 3.2.2 Avaliação do efeito de inibidores através da incubação de discos foliares

O fator A foi composto pelos biótipos MARPR9-RN e LONDS4-S. O fator B foi a incubação de discos foliares em solução com o herbicida 2,4-D (DMA<sup>®</sup> 806 BR SL) na concentração de 9,09 mM, definida com base em estudos anteriores (Queiroz *et al.*, 2022). O fator C foi a incubação prévia dos discos foliares em solução com os inibidores malathion, 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl), azida sódica, imidazole, rutina, ácido triiodobenzoico (TIBA), ácido 1-N-naftilftalâmico (NPA), verapamil, orthovanadato, putrescina, fluoridone, dithiothreitol (DTT) e diethyldithiocarbamato (DDC). As concentrações avaliadas e a ação desses inibidores estão descritas na Tabela 1. Para cada tratamento foram coletados quatro discos foliares de 11 mm de diâmetro de folhas do médio-ápice de plantas no estágio de 6-8 folhas mantidas em câmara de

crescimento (BDR16 Conviron) com temperatura de 25°C, 13 h de fotoperíodo e luminosidade de 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Após a coleta, os discos foram incubados em placas de cultura de tecidos com 12 células contendo 5 mL da solução dos inibidores em cada célula e mantidas em câmara de crescimento. O período de incubação para cada inibidor está descrito na Tabela 1. Após esse período, os discos foliares foram transferidos para placas contendo solução herbicida na concentração de 9,09 mM de 2,4-D e incubados por duas horas.

A determinação da presença de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) após o tratamento com o herbicida foi realizada através da incubação dos discos foliares em solução com hidrocloreto de 3,3'-diaminobenzidina (DAB - 1 mg  $\text{mL}^{-1}$ , pH 3,8) em temperatura ambiente de aproximadamente 24°C por oito horas (Thordal-Christensen *et al.*, 1997). Na sequência, os discos foliares foram descorados com a remoção da clorofila por aquecimento até fervura em etanol 90% por 10 min. Em seguida, os discos foliares foram fotografados e a presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  visualizada pela coloração marrom nos tecidos onde o DAB polimerizou o composto. As imagens foram analisadas no programa ImageJ no qual foi obtida a fração dos discos foliares com coloração associada a testemunha não tratada (coloração amarelo claro) e a ocorrência de rápida necrose (coloração marrom).

### 3.2.3 Avaliação do efeito de inibidores através de aspersão foliar

O fator A foi composto pelos biótipos MARPR9-RN e LONDS4-S. O fator B constou da aspersão do herbicida 2,4-D na dose de 804  $\text{g ha}^{-1}$ , isolada ou precedida pela aplicação de inibidores. Os inibidores avaliados foram malathion, NBD-Cl, azida sódica, imidazole, rutina, verapamil, orthovanadato, putrescina e DDC. As doses avaliadas, intervalo de aplicação com o herbicida e ação dos inibidores estão descritas na Tabela 1.

As plantas foram conduzidas em casa de vegetação climatizada com temperatura média de 28°C  $\pm$  3. A aspersão dos inibidores e do herbicida foi realizada quando as plantas estavam no estágio de 6-8 folhas em câmara de aplicação automatizada (Greenhouse Spray Chamber, modelo Generation III), com ponta de pulverização TJ8002E e volume de calda de 200  $\text{L ha}^{-1}$ . A avaliação dos sintomas foi realizada aos 1, 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT) utilizando-se escala percentual visual, na qual 0% corresponde a ausência de injúria e 100% a morte da planta. As plantas resistentes foram avaliadas quanto à rápida necrose e as plantas suscetíveis quanto aos sintomas de epinastia. Aos 28 DAT foi realizada a avaliação de massa fresca da parte

aérea (MFPA) das plantas e após sete dias em estufa de circulação de ar forçada a 60°C foi determinada a massa seca da parte aérea (MSPA).

A partir dos resultados desse experimento foram selecionados os inibidores verapamil e orthovanadato para avaliação em seis doses, previamente a aspersão do herbicida. As doses utilizadas para orthovanadato foram de 818; 1227; 1636; 2045; 3272 e 4090 g ha<sup>-1</sup>, e para verapamil de 1; 2; 3; 5; 8 e 10 g ha<sup>-1</sup>. Ambos inibidores foram aplicados 6 h antes do tratamento com o herbicida. A aplicação e as avaliações foram realizadas conforme descrito anteriormente.

### 3.2.4 Avaliação do efeito de inibidores em solução hidropônica

O fator A foi composto pelos biótipos MARPR9-RN e LONDS4-S. O fator B foi o herbicida 2,4-D, isolado ou precedido pela aplicação de inibidores. Os inibidores avaliados foram azida sódica, TIBA, NPA, verapamil, orthovanadato, putrescina, fluoridone, DTT e DDC. As concentrações avaliadas e a ação desses inibidores estão descritas na Tabela 1. As plantas no estágio de 4-5 folhas foram conduzidas em solução nutritiva em casa de vegetação climatizada com temperatura média de 28°C ± 3. Após cinco dias de condução na solução controle, os tratamentos foram implantados através da aplicação dos inibidores na solução nutritiva previamente ao herbicida e mantidos por oito horas. Em seguida, a solução nutritiva foi renovada para aplicação do 2,4-D. No primeiro experimento o herbicida foi aplicado na solução nutritiva nas concentrações de 100, 500, 1000, 2000 e 5000 µM e mantido por seis horas. Após esse período a solução foi novamente renovada. No segundo experimento o herbicida foi aplicado por aspersão nas doses de 0, 50, 101, 201, 402 e 804 g ha<sup>-1</sup>, em câmara de aplicação automatizada, conforme descrito anteriormente.

A avaliação dos sintomas foi realizada em 6 horas, 1, 7 e 10 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT) utilizando-se escala percentual visual, na qual 0% corresponde a ausência de injúria e 100% a morte da planta. As plantas resistentes foram avaliadas quanto à rápida necrose e as plantas suscetíveis quanto aos sintomas de epinastia. Aos 10 DAT foi realizada a avaliação de massa fresca da parte aérea (MFPA) e das raízes (MFRA) das plantas e após sete dias em estufa de circulação de ar forçada a 60°C foi determinada a massa seca da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSRA). Também foi avaliado o tempo para início dos sintomas de rápida necrose nas plantas resistentes após a aplicação do herbicida.



TABELA 1. Tratamentos utilizados nos experimentos de avaliação do efeito de inibidores na rápida necrose através da incubação de discos foliares, aspersão foliar e hidroponia.

Inibidor	Experimento	Concentração / Dose	Tempo antes do herbicida	Inibição	Referência
malathion	incubação discos / aspersão foliar	30270 $\mu\text{M}$ / 2000 $\text{g ha}^{-1}$	2 h / 24 h	citocromo P450 monooxigenase	adaptado de Figueiredo <i>et al.</i> , 2018
4-chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl)	incubação discos / aspersão foliar	6760 $\mu\text{M}$ / 270 $\text{g ha}^{-1}$	4 h / 48 h	glutathione-S-transferase	adaptado de Wright <i>et al.</i> , 2016
ázida sódica	incubação discos / aspersão foliar / hidroponia	1990 $\mu\text{M}$ / 26 $\text{g ha}^{-1}$ / 2000 $\mu\text{M}$	1,5 h / 1,5 h / 8 h	catalase / ATPase	adaptado de Bestwick <i>et al.</i> , 1997
imidazole	incubação discos / aspersão foliar	19980 $\mu\text{M}$ / 272 $\text{g ha}^{-1}$	1 h / 0,5 h	NADPH oxidase	adaptado de Orozco-Cardenas <i>et al.</i> , 2001
rutina	incubação discos / aspersão foliar	4000 $\mu\text{M}$ / 488 $\text{g ha}^{-1}$	6 h / 20 h	transportador ABC	adaptado de Yang <i>et al.</i> , 2016
ácido triiodobenzoico (TIBA)	incubação discos / hidroponia	10 $\mu\text{M}$ / 20 $\mu\text{M}$	6 h / 8 h	transportadores de auxina	adaptado de Goggin <i>et al.</i> , 2016
ácido 1-N-naftilftalâmico (NPA)	incubação discos / hidroponia	10 $\mu\text{M}$ / 20 $\mu\text{M}$	6 h / 8 h	transportadores de auxina	adaptado de Goggin <i>et al.</i> , 2016
verapamil	incubação discos / aspersão foliar / hidroponia	10 $\mu\text{M}$ / 1 $\text{g ha}^{-1}$ / 20 $\mu\text{M}$	6 h / 6 h / 8 h	transportadores de auxina	adaptado de Goggin <i>et al.</i> , 2016
orthovanadato	incubação discos / aspersão foliar / hidroponia	2000 $\mu\text{M}$ / 818 $\text{g ha}^{-1}$ / 4000 $\mu\text{M}$	6 h / 6 h / 8 h	transportador ABC	adaptado de Ge <i>et al.</i> , 2014
putrescina	incubação discos / aspersão foliar / hidroponia	100 $\mu\text{M}$ / 3 $\text{g ha}^{-1}$ / 200 $\mu\text{M}$	3 h / 6 h / 8 h	estresse oxidativo	adaptado de Brunharo; Hanson, 2017
fluoridone	incubação discos / hidroponia	10 e 100 $\mu\text{M}$ / 200 $\mu\text{M}$	6 h / 8 h	síntese ácido abscísico	adaptado de Sezgin <i>et al.</i> , 2018
dithiothreitol (DTT)	incubação discos / hidroponia	5000 $\mu\text{M}$ / 200 $\mu\text{M}$	1 h / 8 h	moderador de redox	adaptado de Ferroni <i>et al.</i> , 2021
diethyldithiocarbamato (DDC)	incubação discos / aspersão foliar / hidroponia	1000 $\mu\text{M}$ / 45 $\text{g ha}^{-1}$ / 1000 $\mu\text{M}$	6 h / 6 h / 8 h	superóxido dismutase	adaptado de Aver'yanov <i>et al.</i> , 2019

### 3.2.5 Efeito de alterações da fotossíntese na ocorrência da rápida necrose

O primeiro estudo constou da aplicação em solução nutritiva de inibidores da fotossíntese previamente a aplicação do herbicida. O fator A foi composto pelos biótipos MARPR9-RN e LONDS4-S. O fator B foi o herbicida 2,4-D, isolado ou precedido pela aplicação dos herbicidas inibidores do fotossistema II atrazina e diuron em solução nutritiva. As plantas foram conduzidas conforme descrito anteriormente. Os inibidores atrazina (AclamadoBR<sup>®</sup> SC) e diuron (Diox<sup>®</sup> SC) foram aplicados na solução nutritiva previamente ao herbicida 2,4-D nas concentrações de 100, 500, 1000, 2500, 5000 e 10000  $\mu\text{M}$  e mantidos por nove horas. Em seguida, a solução nutritiva foi renovada e o herbicida foi aplicado na solução na concentração de 2000  $\mu\text{M}$  e mantido por seis horas. Após esse período a solução foi novamente renovada. A avaliação dos sintomas foi realizada em 6 horas, 1 e 7 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT) utilizando-se escala percentual visual, na qual 0% corresponde a ausência de injúria e 100% a morte da planta. As plantas resistentes foram avaliadas quanto à rápida necrose e as plantas suscetíveis quanto aos sintomas de epinastia. Aos 10 DAT foi realizada a avaliação de massa fresca da parte aérea (MFPA) e das raízes (MFRA) das plantas.

O segundo estudo foi realizado em plantas resistentes submetidas a diferentes períodos na ausência de luz. O experimento foi realizado com fator único, sendo avaliado apenas o biótipo resistente ao 2,4-D (MARPR9-RN). As plantas foram inicialmente conduzidas em casa de vegetação climatizada com temperatura média de  $28^{\circ}\text{C} \pm 3$ . Quando as plantas estavam no estágio de 6-8 folhas foram mantidas em incubadora BOD com temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  e luminosidade de  $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  por zero, um, dois e três dias antes do tratamento com o herbicida. Após o período de aclimação das plantas foram aplicadas quatro gotas do herbicida 2,4-D com micropipeta na concentração de 4,02 g ea  $\text{L}^{-1}$  por folha amostrada. Metade das plantas permaneceram na ausência de luz e a outra metade foi transferida para câmara BDR16 com temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  e luminosidade de  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  após a aplicação do herbicida. A avaliação foi realizada em discos foliares de 11 mm de diâmetro coletados do local de aplicação do herbicida nas folhas 90 min após a aplicação e incubados em solução com DAB ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , pH 3,8) à temperatura ambiente por oito horas. A coloração associada ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi determinada no programa ImageJ. As plantas foram fotografadas 5 h após o início dos sintomas e a área de necrose de quatro folhas por tratamento foi mensurada no programa ImageJ. Em ambos

os experimentos também foi avaliado o tempo para início dos sintomas de rápida necrose nas plantas resistentes após a aplicação do herbicida.

### 3.2.6 Análise dos dados

A análise de dados foi realizada no software estatístico R v.3.6.3. Os dados obtidos em todos os experimentos foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e à análise de variância (ANOVA  $p \leq 0,05$ ) usando o pacote *Expdes.pt*. Quando a análise foi significativa foi realizado teste de comparação de médias (Tukey,  $p \leq 0,05$ ) para os experimentos com fatores qualitativos. Nos experimentos que avaliaram o fator dose / concentração dos inibidores ou do herbicida quando verificada a interação entre os fatores foi realizada análise de regressão usando o pacote *drc*, com ajuste dos dados pelo modelo não-linear log-logístico de quatro parâmetros:  $y = (y_0 + a) * ((x/x_0)^b) / (1 + (x/x_0)^b)$ . Os gráficos foram elaborados no software SigmaPlot v.14.0.

## 3.3 Resultados e Discussão

### 3.3.1 Avaliação do efeito de inibidores através da incubação de discos foliares

A incubação de discos foliares em solução com os inibidores aplicados previamente a incubação no herbicida 2,4-D não evitou complementarmente a produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) no biótipo resistente MARPR9-RN ou induziu seu acúmulo no biótipo suscetível LONDS4-S (Figura 1). Contudo, para o biótipo resistente os inibidores azida sódica e orthovanadato promoveram redução significativa do estresse oxidativo, que foi aproximadamente 64 e 62%, respectivamente, em comparação com 90% de  $H_2O_2$  obtido com a incubação dos discos apenas no herbicida (Figura 2A). O orthovanadato atua na inibição de transportadores ABC (Geisler & Murphy, 2005) e possivelmente está relacionado à limitação do transporte de auxinas. Da mesma forma, azida sódica também pode estar associada a redução do transporte de auxina limitando a energia disponível para a ação dos transportadores ABC, pois inibe a ATPase (Petersson *et al.*, 2009). A redução do efluxo do herbicida 2,4-D para fora das células pela ação desses inibidores restringe a translocação e assim a quantidade de células afetadas pelo herbicida, reduzindo o estresse oxidativo observado.

Os inibidores rutina, TIBA, NPA, fluoridone, DTT e DDC não apresentaram variação no acúmulo de  $H_2O_2$  (Figura 1). Porém, os inibidores imidazole, verapamil e putrescina também causaram redução no acúmulo de  $H_2O_2$  no biótipo MARPR9-RN, próximo à 80% de  $H_2O_2$  (Figura 2A), mas que não foi significativamente diferente do tratamento controle somente com 2,4-D (90%). Imidazole atua na inibição da enzima NADPH oxidase relacionada a produção de espécies reativas de oxigênio (Orozco-Cardenas *et al.*, 2001). A inibição dessa enzima poderia resultar no menor estresse oxidativo, contudo sua atividade não foi descrita na resistência a herbicidas. Verapamil, um inibidor de transportadores ABC, reduziu o movimento de 2,4-D de folha tratada para o caule de plantas de *Raphanus raphanistrum* suscetíveis ao herbicida, mas promoveu o aumento inesperado da translocação de 2,4-D para fora da folha tratada e para o caule de plantas de resistentes (Goggin *et al.*, 2016). Contudo, a relação dessa resposta com a resistência não foi identificada. Putrescina, uma poliamina envolvida nas rotas de defesa da planta, promoveu o aumento da resistência ao estresse oxidativo quando aplicada previamente ao herbicida paraquat (inibidor do fotossistema I) em plantas resistentes de *Conyza bonariensis* (Ye *et al.*, 1997). Contudo, a atividade dessa poliamina não foi descrita na resistência a herbicidas auxínicos.

Discos foliares do biótipo LONDS4-S previamente incubados com malathion apresentaram o dobro do estresse oxidativo identificado nos discos tratados apenas com o herbicida (Figuras 1 e 2B), semelhante ao acúmulo de  $H_2O_2$  identificado no biótipo resistente. Como descrito por Queiroz *et al.* (2021), esse inibidor é capaz de induzir o estresse oxidativo pela própria atividade (Srivastava & Singh, 2020), ou então pode interferir na resposta celular ao 2,4-D. Todos os discos foliares incubados em NBD-Cl apresentaram elevados níveis de estresse oxidativo, tanto na presença como na ausência do herbicida em ambos os biótipos (Figura 2A e B). Provavelmente esse resultado ocorreu devido à presença de acetona na diluição do inibidor (Queiroz *et al.*, 2022) e não está relacionado ao efeito de enzimas de detoxificação na ocorrência de estresse oxidativo.

	controle	malathion	NBD-Cl	azida sódica	imidazole	rutina	TIBA
<b>MARPR9-RN</b> sem herbicida							
<b>MARPR9-RN</b> 2,4-D							
<b>LONDS4-S</b> sem herbicida							
<b>LONDS4-S</b> 2,4-D							
	NPA	verapamil	orthovanadato	putrescina	fluoridone	DTT	DDC
<b>MARPR9-RN</b> sem herbicida							
<b>MARPR9-RN</b> 2,4-D							
<b>LONDS4-S</b> sem herbicida							
<b>LONDS4-S</b> 2,4-D							

FIGURA 1. Presença de peróxido de hidrogênio em discos foliares de *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN) e suscetível (LONDS4-S) ao herbicida 2,4-D após tratamento com diferentes inibidores e 2 horas de incubação em solução de 2,4-D (9,09 mM). A coloração marrom dos tecidos indica a presença de estresse oxidativo.

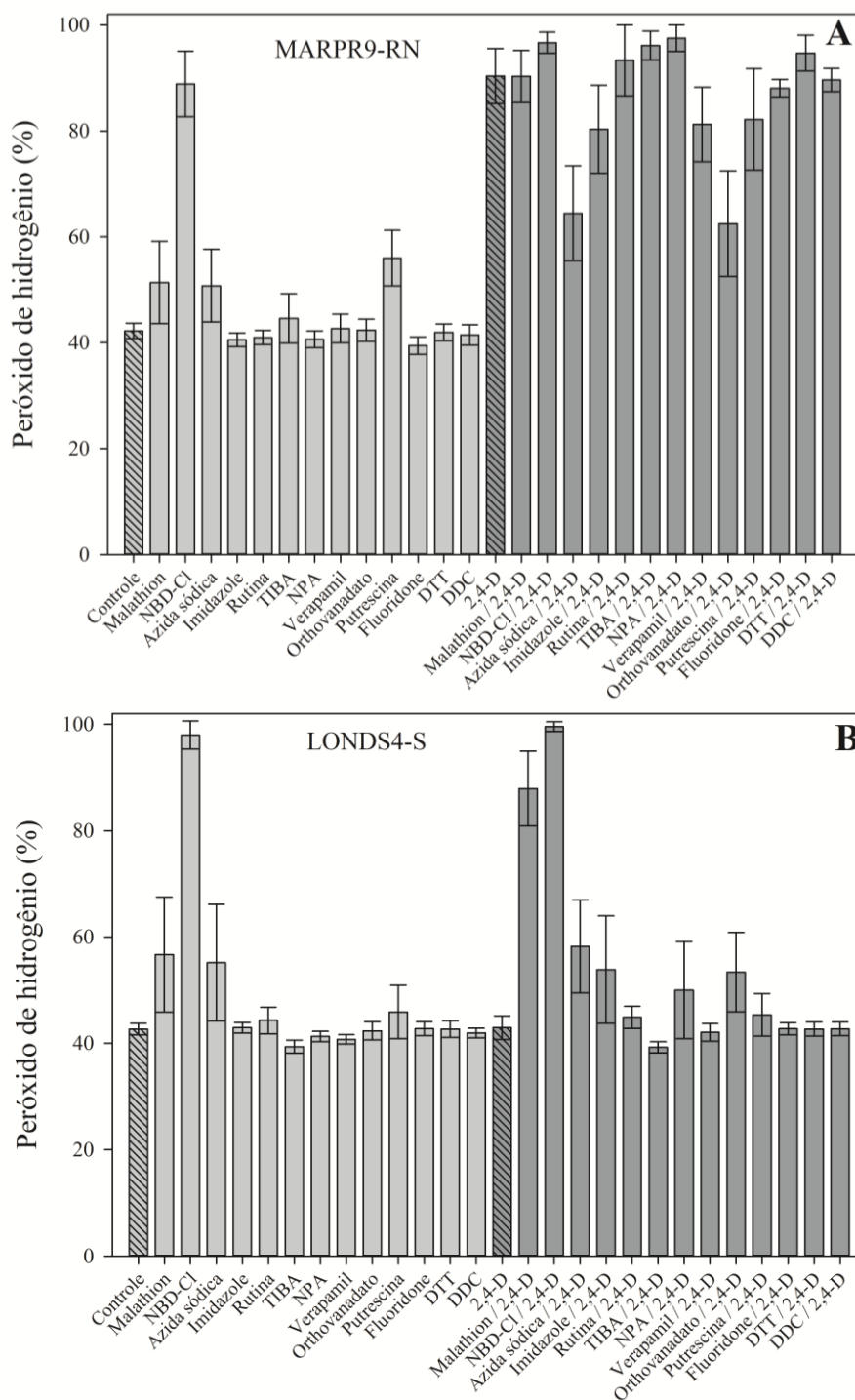


FIGURA 2. Presença de peróxido de hidrogênio (%) em discos foliares de *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN) (A) e suscetível (LONDS4-S) (B) ao herbicida 2,4-D após tratamento com diferentes inibidores e 2 horas de incubação em solução de 2,4-D (9,09 mM). Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).

### 3.3.2 Avaliação do efeito de inibidores através de aspersão foliar

Os inibidores avaliados em aspersão foliar não reverteram o fenótipo de rápida necrose foliar nas plantas resistentes e não promoveram esses sintomas nas plantas suscetíveis em resposta ao 2,4-D. No biótipo LONDS4-S foi observada redução dos sintomas de epinastia na avaliação de 1 DAT (dia após o tratamento) para os tratamentos com verapamil, orthovanadato, putrescina e DDC aplicados previamente ao herbicida em relação ao efeito isolado de 2,4-D (Figura 3A). No biótipo resistente MARPR9-RN o inibidor orthovanadato promoveu a redução da rápida necrose para aproximadamente 33% em relação aos 51% obtidos na aplicação isolada do herbicida em 1 DAT (Figura 3B). Aos 28 DAT foi observado controle das plantas suscetíveis com todos os tratamentos (Figura 3C) e nas plantas resistentes, orthovanadato e verapamil promoveram aproximadamente 68 e 75% de injúria, respectivamente, em comparação a 48% de injúria das plantas tratadas apenas com o herbicida (Figura 3D). A aplicação desses inibidores de transportadores ABC previamente ao herbicida não foi capaz de reverter a resistência relacionada a rápida necrose. Entretanto, o aumento significativo da injúria nas plantas resistentes tratadas com esses inibidores é um indicativo de que alterações nas enzimas transportadoras de auxinas podem estar relacionadas ao mecanismo de resistência ao 2,4-D em *C. sumatrensis*. Os inibidores NBD-Cl, imidazole e DDC também reduziram a necrose em 1 DAT, mas aos 28 DAT promoveram resposta semelhante ao 2,4-D isolado no biótipo MARPR9-RN (Figura 3B e D). Para variável massa fresca da parte aérea (MFPA) não houve diferença entre a aplicação isolada de 2,4-D e os tratamentos com os inibidores para ambos os biótipos (Figura 3E e F).

Os resultados indicam que a detoxificação do herbicida 2,4-D por enzimas cytP450 e GST possivelmente não está relacionada com a resistência em *C. sumatrensis* devido ao não efeito dos inibidores dessas enzimas, malathion e NBD-Cl, respectivamente. A atividade de enzimas cytP450 na metabolização do herbicida 2,4-D foi identificada como principal processo envolvido na resistência em *Papaver rhoeas* a esse herbicida (Torra *et al.*, 2021). Ainda, a aplicação prévia de malathion reduziu em sete vezes a GR50 (dose que ocasiona 50% de redução do crescimento) de plantas de *Amaranthus tuberculatus* resistente, indicando a detoxificação do herbicida 2,4-D como provável mecanismo de resistência (Figueiredo *et al.*, 2018).

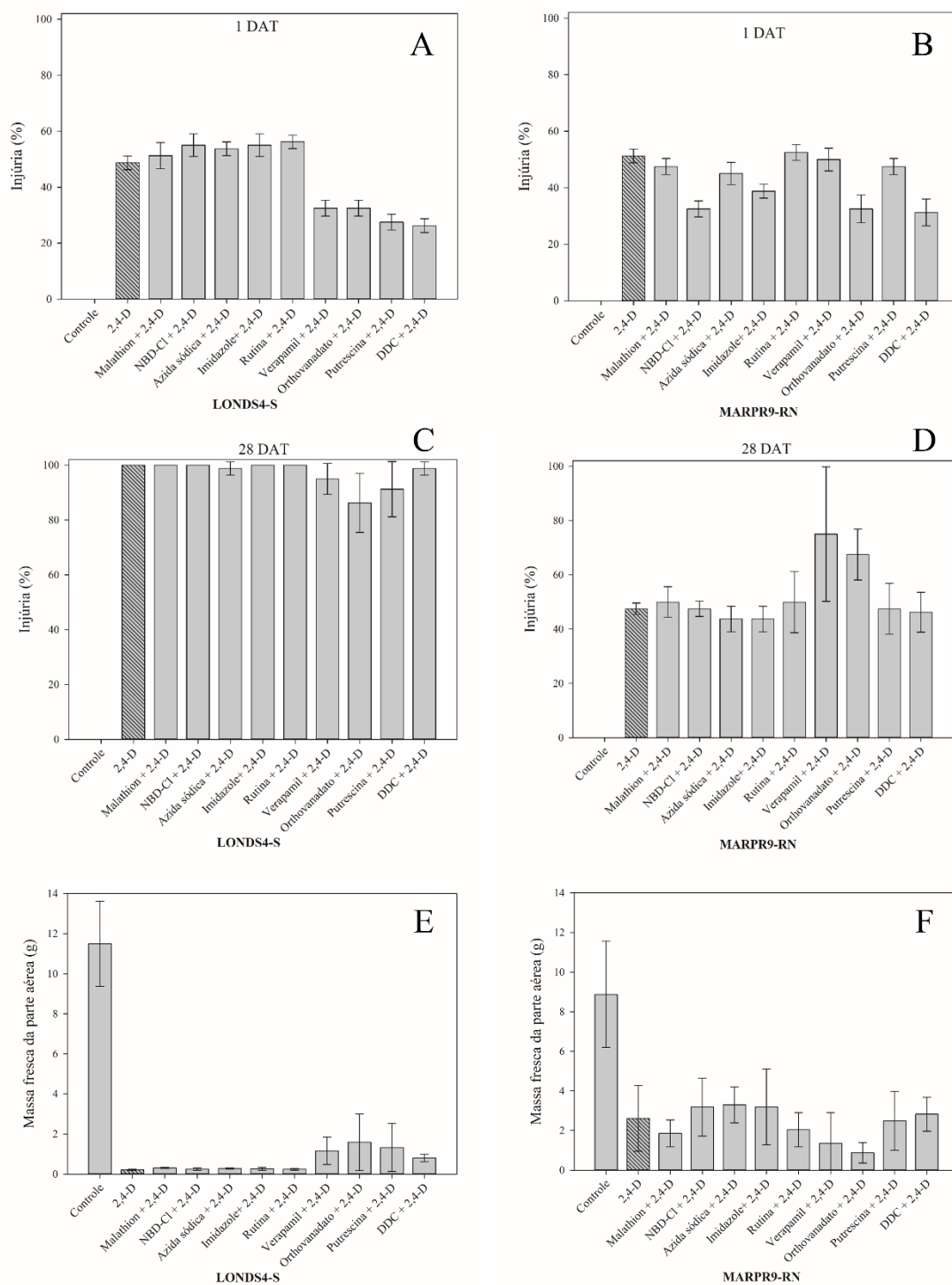


FIGURA 3. Injúria relacionada à epinastia no biótipo suscetível (LONDS4-S) (A, C e E) e à rápida necrose no biótipo resistente ao herbicida 2,4-D (MARPR9-RN) (B, D e F) de *Conyza sumatrensis* aos 1 (A e B) e 28 (C e D) dias após tratamento (DAT) e matéria fresca da parte aérea (MFPA) (E e F) aos 28 dias após a aspersão de inibidores (dose conforme Tabela 1) e 2,4-D (804 g ha<sup>-1</sup>). Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).



Com base nos resultados obtidos no estudo anterior foi avaliada a aspersão de diferentes doses dos inibidores orthovanadato e verapamil, previamente a aplicação do herbicida 2,4-D. Esses inibidores não reverteram os sintomas de rápida necrose em nenhuma das doses avaliadas no biótipo resistente na avaliação aos 2 DAT (Figuras 4A e B; 5A e B). Aos 28 DAT os inibidores promoveram aumento do efeito do herbicida no controle do biótipo resistente resultando em níveis de injúria de até 95 e 75% para orthovanadato e verapamil, respectivamente, em algumas das doses avaliadas (Figuras 4C e D; 5C e D). O fator de resistência (FR) para injúria foi superior na avaliação aos 28 DAT em relação a avaliação aos 2 DAT para orthovanadato e verapamil (Tabelas 2 e 3). Para avaliação de MFPA aos 28DAT o FR foi significativo para ambos os inibidores (Tabelas 2 e 3).

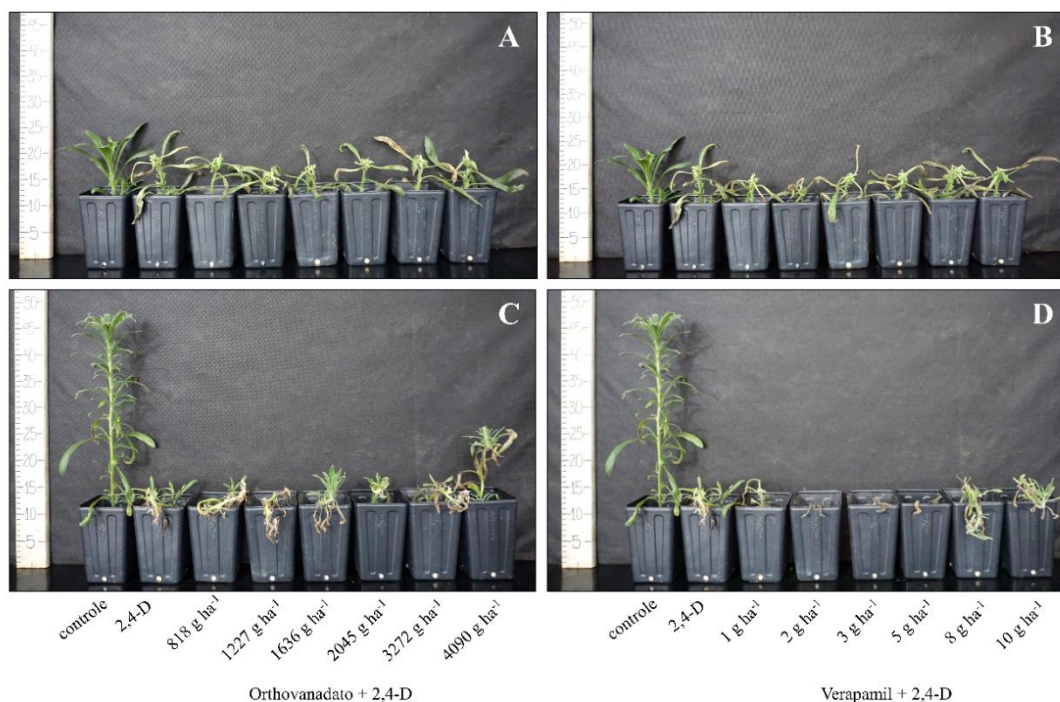


FIGURA 4. Injúria em plantas de *Conyza sumatrensis* resistentes (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D por rápida necrose após a aspersão do herbicida com tratamento dos inibidores orthovanadato (A e C) e verapamil (B e D) aos 2 (A e B) e 28 (C e D) DAT (dias após o tratamento).

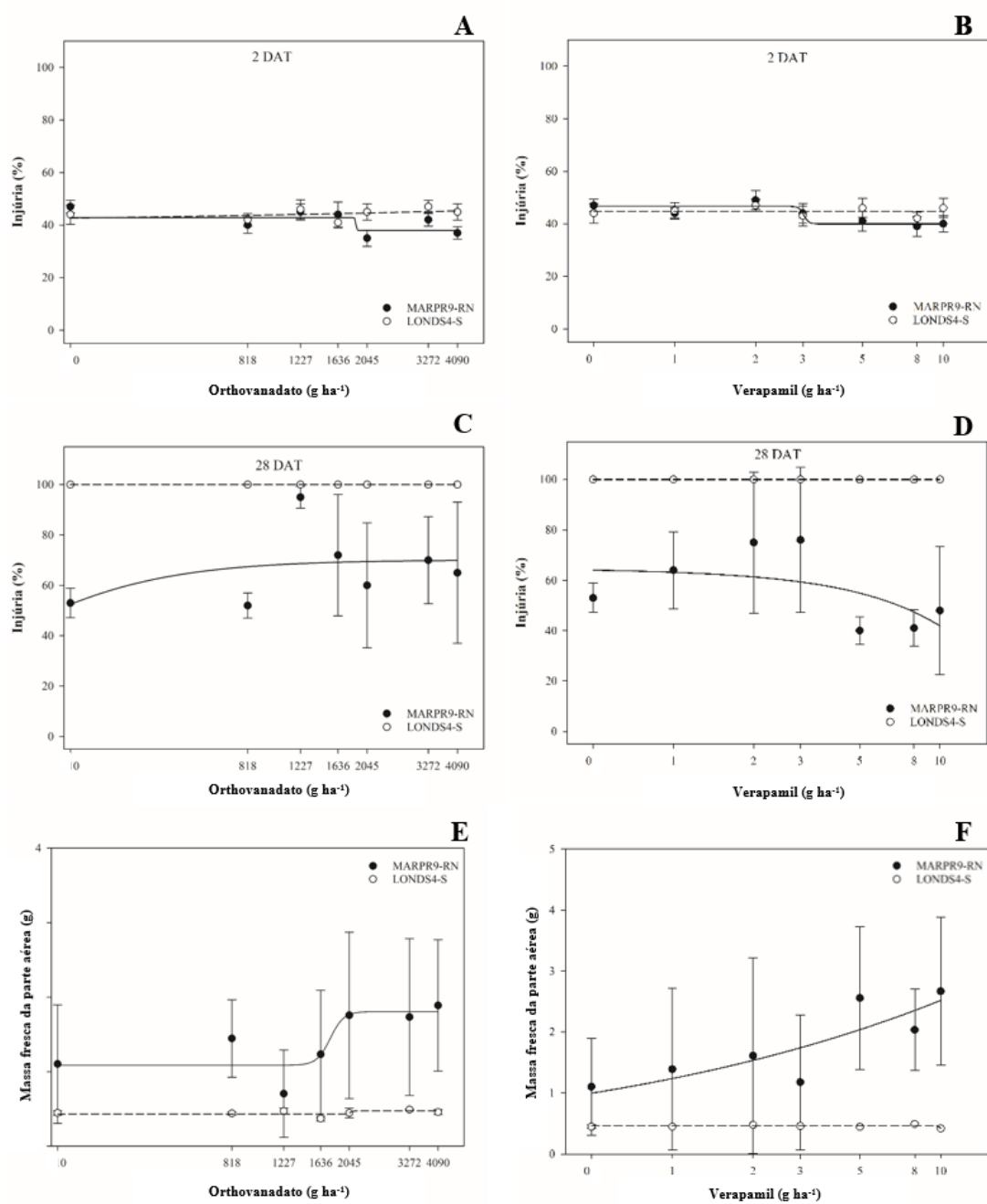


FIGURA 5. Injúria aos 2 (A e B) e 28 (C e D) DAT (dias após o tratamento) e matéria fresca da parte aérea (MFPA) (E e F) aos 28 DAT em biótipos de *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN) e suscetível (LONDS4-S) ao 2,4-D após aspersão do herbicida com tratamento dos inibidores orthovanadato (A, C, E) e verapamil (B, D, F). Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).

TABELA 2. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis injúria aos 2 e 28 DAT e massa fresca da parte aérea em biótipos de *Conyza sumatrensis* suscetível (LONDS4-S) e resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D após a aspersão do inibidor orthovanadato previamente ao 2,4-D (804 g ha<sup>-1</sup>).

Biótipos	Parâmetros da equação				IC		FR
	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i> (C50 ou GR50)	Min	Max	
Injúria 2 DAT							
LONDS4-S	-37,416 <sup>ns</sup>	43,250*	46,001*	2015,00	1591,14	2438,89	
MARPR9-RN	0,524 <sup>ns</sup>	17,388 <sup>ns</sup>	46,923*	1849,08	-843,84	3542,24	0,92 <sup>ns</sup>
Injúria 28 DAT							
LONDS4-S	0,958 <sup>ns</sup>	99,185*	99,483*	4,46	-5092,30	5101,30	
MARPR9-RN	8,95E-05 <sup>ns</sup>	85,182*	53,044*	1763,10	1743,20	1783,10	395,31*
Massa fresca da parte aérea 28 DAT							
LONDS4-S	-0,611 <sup>ns</sup>	0,434 <sup>ns</sup>	0,463 <sup>ns</sup>	1,31E+08	1,31E+08	1,31E+08	
MARPR9-RN	-1,717*	1,086*	1,807*	6790,30	6770,30	6810,20	5,19E-05 *

\*significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; C50: dose necessária para controle de 50%; GR50: dose necessária para reduzir o crescimento da planta em 50%. FR: fator de resistência.

TABELA 3. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis injúria aos 2 e 28 DAT e massa fresca da parte aérea em biótipos de *Conyza sumatrensis* suscetível (LONDS4-S) e resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D após a aspersão do inibidor verapamil previamente ao 2,4-D (804 g ha<sup>-1</sup>).

Biótipos	Parâmetros da equação				IC		FR
	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i> (C50 ou GR50)	Min	Max	
Injúria 2 DAT							
LONDS4-S	0,004 <sup>ns</sup>	45,830 <sup>ns</sup>	43,919*	1,85	-867,53	871,23	
MARPR9-RN	5,113 <sup>ns</sup>	39,514*	46,592*	3,64	1,54	5,75	1,97 <sup>ns</sup>
Injúria 28 DAT							
LONDS4-S	0,208 <sup>ns</sup>	98,323*	99,894*	0,64	0,38	2,34	
MARPR9-RN	18,873*	42,966*	66,998*	3,98	1,89	6,07	6,22 *
Massa fresca da parte aérea 28 DAT							
LONDS4-S	-0,218 <sup>ns</sup>	0,446 <sup>ns</sup>	0,445 <sup>ns</sup>	1,08E+07	1,08E+07	1,08E+07	
MARPR9-RN	-47,048*	1,319*	2,420*	3,86	-14,63	22,36	3,56E-07 *

\*significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; C50: dose necessária para controle de 50%; GR50: dose necessária para reduzir o crescimento da planta em 50%. FR: fator de resistência.

Os resultados desse estudo indicam que os inibidores proporcionaram aumento de efeito do herbicida 2,4-D no controle do biótipo resistente. Apesar dos sintomas de rápida necrose relacionados a resistência terem surgido no biótipo MARPR9-RN após a aplicação prévia de orthovanadato e verapamil ao 2,4-D, esses dois inibidores atenuaram a necrose, proporcionando maior efeito do herbicida e assim reduziram a capacidade de rebrote das plantas a partir das gemas axilares e do meristema, permitindo maior injúria

e até mesmo controle total de algumas plantas. Ou seja, os inibidores não reverteram o fenótipo de rápida necrose, mas seu efeito afetou a capacidade de rebrote das plantas associada a estratégia de resistência que permite a sobrevivência do biótipo à aplicação do herbicida 2,4-D. Possivelmente, a inibição dos transportadores ABC alterou a movimentação do 2,4-D dos tecidos jovens para as folhas maduras, afetando assim a capacidade de rebrote desses tecidos. Os resultados obtidos com a aspersão prévia ao herbicida de orthovanadato e verapamil correspondem a redução do estresse oxidativo promovida por esses inibidores de transportadores ABC no estudo anterior com discos foliares. Os transportadores ABC realizam o transporte polar de auxinas através da membrana celular com a energia da hidrólise de ATP (Geisler, 2021). Em *Arabidopsis thaliana* observou-se que uma mutação semidominante no gene *PDR9* (transportador ABC - homólogo PDR) proporcionou o aumento da tolerância das plantas ao herbicida 2,4-D, enquanto que a perda de função nesse gene conferiu aumento da sensibilidade ao herbicida, pela inibição do crescimento de raízes (Ito & Gray, 2006).

O transportador ABCB19 foi associado a resistência ao 2,4-D em plantas de *R. raphanistrum* sem fenótipo de rápida necrose. Inicialmente, a hipótese era de que a translocação reduzida do herbicida nas plantas resistentes ocorria devido à perda de função de transportadores do tipo ABC (Goggin *et al.*, 2016). Contudo, estudo recente revelou que níveis mais baixos de ABCB19 não estão correlacionados com a translocação reduzida, mas que quantidades elevadas dessa proteína é que estão associadas a capacidade de crescimento das plantas resistentes após o tratamento com o herbicida (Goggin *et al.*, 2020). A hipótese atual é de que o transportador ABCB19 presente em maior quantidade na planta resistente seja responsável por aumentar o transporte de 2,4-D do meristema apical para as folhas maduras, reduzindo a quantidade de herbicida nas partes sobreviventes da planta (Goggin *et al.*, 2020). Entretanto, ainda não é conhecida a função do 2,4-D como substrato desse transportador em plantas. Os resultados relacionados aos transportadores ABC obtidos no presente estudo e os relacionados ao transportador ABCB19 em *R. raphanistrum* indicam a associação dos processos envolvidos na movimentação transmembrana com a resistência ao herbicida 2,4-D. Portanto, é possível que plantas de *C. sumatrensis* resistentes ao 2,4-D tenham maior atividade de transportadores ABC que movimentam o herbicida do meristema e tecidos novos para as folhas maduras e assim promovam o rebrote da planta a partir desses tecidos. Contudo, outros genes devem estar envolvidos com a resposta inicial de rápida

morte celular dos tecidos maduros, de forma que o herbicida não seja transportado no sentido fonte-dreno através do floema e cause a morte dos tecidos jovens também.

### 3.3.3 Avaliação do efeito de inibidores em solução hidropônica

A avaliação dos inibidores em sistema de hidroponia buscou favorecer a absorção radicular pelas plantas dos inibidores aplicados na solução nutritiva. A absorção radicular do herbicida 2,4-D aplicado em solução nutritiva promoveu a ocorrência de rápida necrose dos tecidos nas plantas resistentes (Figura 6A) e dos sintomas clássicos de epinastia nas plantas suscetíveis (Figura 6B), similar ao que ocorre com a aspersão foliar (Figura 6C e D). Entretanto, a rápida necrose foi mais intensa e ocorreu também no meristema foliar, resposta não observada quando o herbicida é aplicado através de aspersão (Figura 6C). Além disso, não foi observado o rebrote das plantas conduzidas em hidroponia após a aplicação do herbicida 2,4-D tanto na solução nutritiva, como por aspersão. Aos 10 DAT foi observado o controle total das plantas resistentes e suscetíveis ao 2,4-D nas maiores doses (Figura 8A).

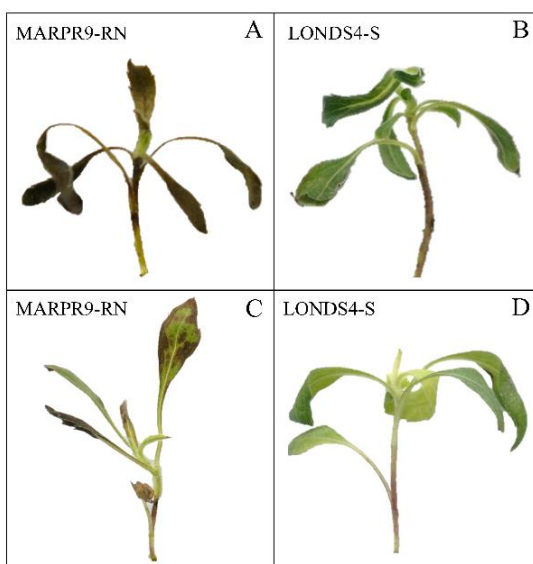


FIGURA 6. Injúria 1 dia após o tratamento (DAT) com o herbicida 2,4-D através da aplicação em solução nutritiva (A e B) e por aspersão (C e D) em biótipos de *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN) (A e C) e suscetível (LONDS4-S) (B e D).

De forma similar ao observado nos estudos anteriores, nenhum dos inibidores avaliados reverteu completamente a resistência no biótipo MARPR9-RN. No entanto, em

comparação com a aplicação isolada do herbicida os inibidores orthovanadato, verapamil e putrescina atrasaram o início da necrose nas plantas resistentes para algumas concentrações do 2,4-D aplicado em solução nutritiva (Figura 7). Para a concentração de 100  $\mu\text{M}$  os sintomas não foram observados em até 360 min, período em que as plantas permaneceram na solução herbicida. Quanto a magnitude dos sintomas visuais, em relação ao herbicida isolado aplicado na solução nutritiva (Figura 8A), a aplicação prévia de orthovanadato proporcionou a ocorrência de necrose superior em algumas concentrações (Figura 8B). No entanto, a aplicação prévia de verapamil (Figura 8C) e putrescina (Figura 8D) reduziu a necrose em 1 DAT nas plantas resistentes. O maior efeito foi observado na concentração de 1000  $\mu\text{M}$ , na qual o herbicida isolado promoveu aproximadamente 40% de injúria, enquanto que não foi observada necrose com a aplicação prévia dos inibidores. O fator de resistência (FR) para injúria não foi significativo na avaliação de 1 DAT para nenhum dos tratamentos. Contudo, houve a redução do fator de resistência do herbicida isolado com a aplicação prévia dos inibidores orthovanadato, verapamil e putrescina na avaliação de 10 DAT (Tabela 4). Esse resultado indica o efeito desses inibidores na redução da resistência do biótipo MARPR9-RN. A resposta a aplicação dos demais inibidores foi similar ao observado com a aplicação isolada do herbicida (dados não apresentados).

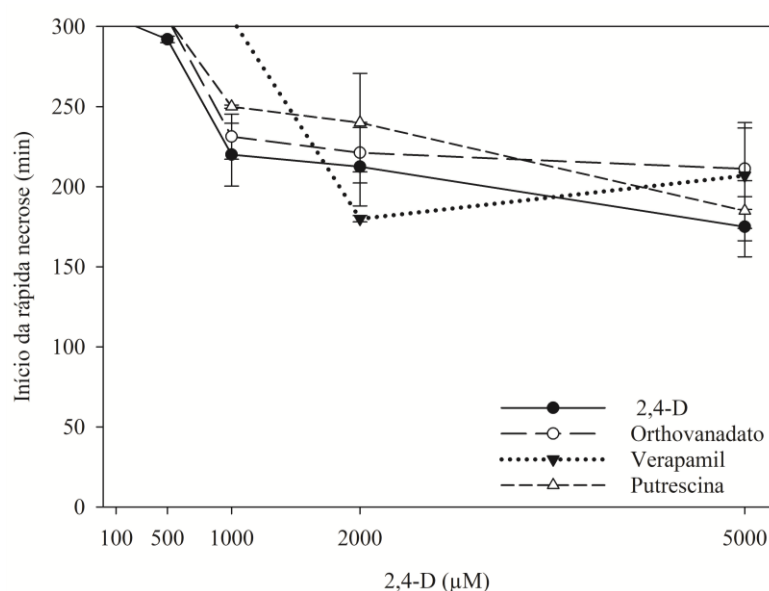


FIGURA 7. Tempo para início da rápida necrose após a aplicação do herbicida 2,4-D em solução nutritiva isolado ou precedido pela aplicação dos inibidores orthovanadato, verapamil e putrescina em biótipo de *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN). Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).

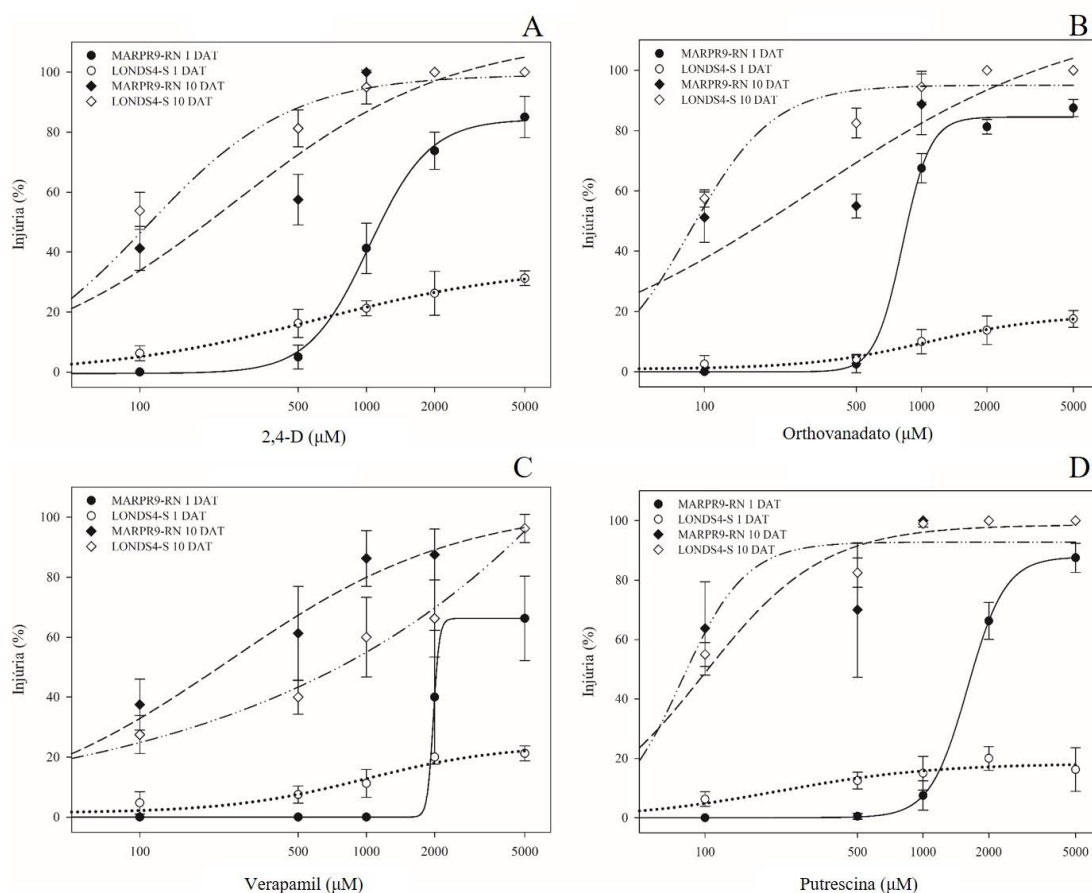


FIGURA 8. Injúria aos 1 e 10 dias após a aplicação (DAT) do herbicida 2,4-D em solução nutritiva isolado (A) ou precedido pela aplicação dos inibidores orthovanadato (B), verapamil (C) e putrescina (D) em biótipo de *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN). Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).

A avaliação de verapamil aplicado em solução nutritiva previamente a aspersão foliar do herbicida 2,4-D proporcionou a inibição do movimento de [ $^{14}\text{C}$ ]2,4-D de folhas tratadas para o caule em biótipo suscetível de *R. raphanistrum*, mas aumentou a translocação do herbicida para o caule no biótipo resistente. Nesse mesmo trabalho os inibidores de transportadores de auxinas NPA e TIBA não afetaram a distribuição de 2,4-D nas plantas resistentes, mas inibiram a sua translocação para fora da folha tratada no biótipo suscetível (Goggin *et al.*, 2016). No presente estudo esses dois inibidores não apresentaram efeito em nenhum dos biótipos. A putrescina é uma poliamina descrita nas rotas de síntese de ácido abscísico, ácido indol acético e ácido salicílico em plantas, atuando na eliminação de radicais livres e na prevenção da peroxidação lipídica (Gill & Tuteja, 2010; Anwar *et al.*, 2015). Devido a isso, a sua aplicação exógena em plantas sob condições adversas é uma estratégia para o estudo da resposta de estresse dependente de

poliaminas, pois essas moléculas induzem a resistência ao estresse oxidativo (González-Hernández *et al.*, 2022). Assim, é possível que o aumento na resistência ao estresse oxidativo induzido pela putrescina possa ser responsável pela redução da rápida necrose observada no biótipo MARPR9-RN após o tratamento com 2,4-D no presente estudo e não esteja relacionada ao mecanismo de resistência.

TABELA 4. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis injúria aos 1 e 10 DAT em biótipos de *Conyza sumatrensis* suscetível (LONDS4-S) e resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D após a aplicação de inibidores previamente a aplicação de 2,4-D nas concentrações de 100, 500, 1000, 2000 e 5000  $\mu\text{M}$  em solução nutritiva.

Biótipos	Parâmetros da equação				IC		FR
	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i> (C50)	Min	Max	
<b>2,4-D</b>							
Injúria 1 DAT							
LONDS4-S	-0,812*	-0,033 <sup>ns</sup>	37,678*	7105,55	296,60	7207,70	
MARPR9-RN	-3,241*	-0,655 <sup>ns</sup>	84,319*	1026,80	938,50	1115,11	0,14 <sup>ns</sup>
Injúria 10 DAT							
LONDS4-S	-1,044*	0,149 <sup>ns</sup>	100,000*	89,85	54,59	125,13	
MARPR9-RN	-1,065*	1,464 <sup>ns</sup>	100,000*	178,59	111,52	245,66	1,99*
<b>Orthovanadato</b>							
Injúria 1 DAT							
LONDS4-S	-0,683 <sup>ns</sup>	0,043 <sup>ns</sup>	25,908 <sup>ns</sup>	7354,30	-3041,40	9566,00	
MARPR9-RN	-1,053*	-0,588 <sup>ns</sup>	90,000*	910,52	-3050,20	1570,10	0,12 <sup>ns</sup>
Injúria 10 DAT							
LONDS4-S	-0,598*	0,908 <sup>ns</sup>	100,000*	121,94	58,66	185,22	
MARPR9-RN	-0,816*	0,321 <sup>ns</sup>	100,000*	145,22	45,92	115,13	1,19*
<b>Verapamil</b>							
Injúria 1 DAT							
LONDS4-S	-1,702 <sup>ns</sup>	1,037 <sup>ns</sup>	18,065*	7719,89	-1,76	7841,54	
MARPR9-RN	-3,926*	2,651 <sup>ns</sup>	75,502*	1726,38	1546,61	1906,15	0,22 <sup>ns</sup>
Injúria 10 DAT							
LONDS4-S	-0,740*	1,311 <sup>ns</sup>	100,000*	843,32	142,59	969,51	
MARPR9-RN	-0,878*	0,431 <sup>ns</sup>	100,000*	186,32	85,46	197,55	0,22*
<b>Putrescina</b>							
Injúria 1 DAT							
LONDS4-S	-0,723 <sup>ns</sup>	-0,024 <sup>ns</sup>	16,816*	7275,67	-281,32	7832,66	
MARPR9-RN	-4,187*	2,031*	85,675*	1522,70	1428,95	1616,46	0,21 <sup>ns</sup>
Injúria 10 DAT							
LONDS4-S	-0,920*	-0,097 <sup>ns</sup>	100,000*	86,64	70,91	102,37	
MARPR9-RN	-1,081*	-0,096 <sup>ns</sup>	100,000*	66,89	54,50	79,27	0,77*

\*significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; C50: dose necessária para controle de 50%. FR: fator de resistência.



Os inibidores orthovanadato, verapamil e putrescina que apresentaram efeito na redução do fenótipo de rápida necrose no estudo anterior também foram avaliados através da absorção radicular com a aspersão foliar do herbicida. A aspersão isolada do herbicida proporcionou o início dos sintomas de rápida necrose de 120 a 210 min após o tratamento para doses superiores a 101 g ha<sup>-1</sup>. A aplicação prévia dos inibidores orthovanadato, verapamil e putrescina atrasou o início dos sintomas principalmente nas doses mais baixas para o biótipo resistente. Para dose de 50 g ha<sup>-1</sup> os sintomas não foram observados em até 360 min (Figura 9). Quanto aos sintomas visuais, o herbicida isolado (Figura 10A) nas concentrações mais baixas e intermediárias causou maior injúria nas plantas resistentes na avaliação 1 DAT em comparação com plantas tratadas com os inibidores orthovanadato (Figura 10B), verapamil (Figura 10C) e putrescina (Figura 10D). O fator de resistência para injúria foi significativo apenas para avaliação de 10 DAT com tratamento de verapamil (Tabela 5).

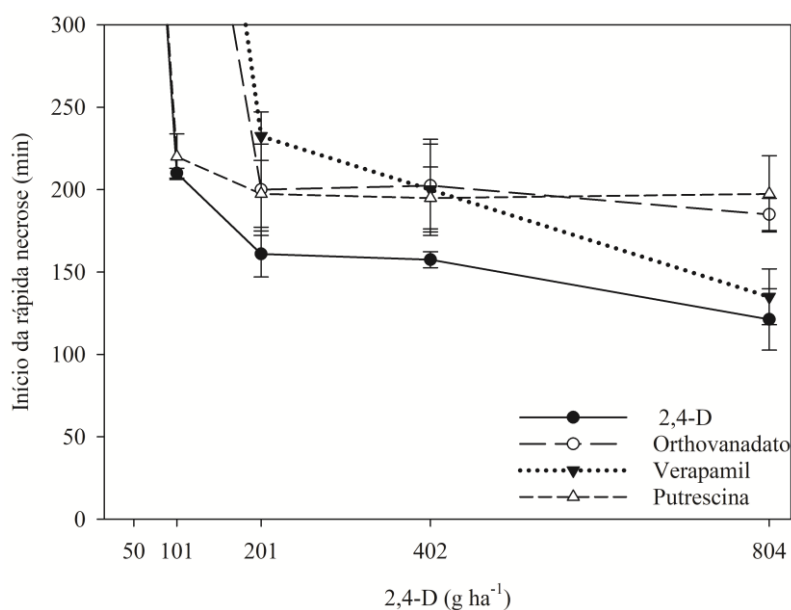


FIGURA 9. Tempo para início da rápida necrose após a aspersão do herbicida 2,4-D isolado ou precedido pela aplicação dos inibidores orthovanadato, verapamil e putrescina em biótipo de *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN). Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).

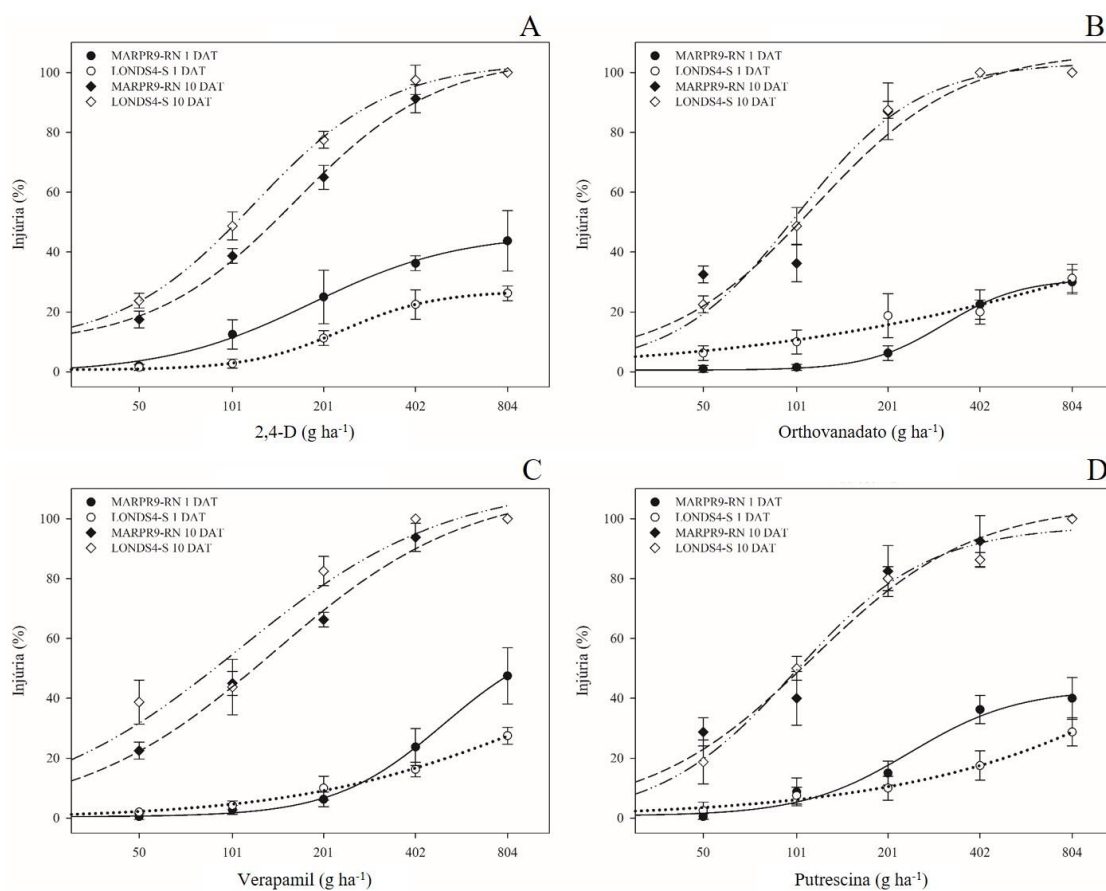


FIGURA 10. Injúria aos 1 e 10 dias após a aspersão (DAT) do herbicida 2,4-D isolado (A) ou precedido pela aplicação dos inibidores orthovanadato (B), verapamil (C) e putrescina (D) em biótipo de *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN). Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).

Em geral, os sintomas de rápida necrose nas plantas resistentes foram até 50 a 60% menos intensos quando o herbicida foi aplicado em aspersão foliar em comparação com a aplicação na solução nutritiva. O efeito de 2,4-D aplicado através de aspersão em plantas de *C. sumatrensis* resistentes promove a absorção foliar e a ocorrência localizada de sintomas de rápida necrose em folhas maduras, mas não em meristemas e folhas jovens (Queiroz *et al.*, 2020). Nesse experimento, quando as plantas foram conduzidas em hidroponia a aspersão foliar do herbicida promoveu sintomas semelhantes a esses no biótipo resistente. Entretanto, o herbicida 2,4-D também é absorvido pelas raízes e distribuído para todas as partes da planta (Grossmann, 2003). Assim, quando o herbicida foi aplicado na solução nutritiva os sintomas de rápida necrose ocorreram de forma generalizada na planta, atingindo também os meristemas, devido a absorção radicular e a translocação do 2,4-D para os tecidos jovens.

TABELA 5. Parâmetros da equação log-logística para as variáveis injúria aos 1 e 10 DAT em biótipos de *Conyza sumatrensis* suscetível (LONDS4-S) e resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D após a aplicação de inibidores previamente a aspersão de 2,4-D nas doses de 0, 50, 101, 201, 402 e 804 g ha<sup>-1</sup>.

Biótipos	Parâmetros da equação				IC		FR
	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i> (C50)	Min	Max	
<b>2,4-D</b>							
Injúria 1 DAT							
LONDS4-S	-1,270*	0,006 <sup>ns</sup>	26,957*	1391,47	585,05	2197,89	
MARPR9-RN	-1,426*	-0,743 <sup>ns</sup>	58,690*	845,90	398,82	1292,98	0,61 <sup>ns</sup>
Injúria 10 DAT							
LONDS4-S	-0,959*	0,313 <sup>ns</sup>	100,000*	106,27	66,33	146,21	
MARPR9-RN	-1,357*	0,637 <sup>ns</sup>	100,000*	115,69	91,93	139,45	1,09 <sup>ns</sup>
<b>Orthovanadato</b>							
Injúria 1 DAT							
LONDS4-S	-0,512*	-0,035 <sup>ns</sup>	42,565 <sup>ns</sup>	1223,62	345,78	2101,47	
MARPR9-RN	-1,333*	-0,026 <sup>ns</sup>	42,574 <sup>ns</sup>	1354,68	436,47	8245,84	1,11 <sup>ns</sup>
Injúria 10 DAT							
LONDS4-S	-0,856*	-0,061 <sup>ns</sup>	100,000*	104,71	61,75	147,67	
MARPR9-RN	-1,482*	-0,061 <sup>ns</sup>	100,000*	82,19	70,90	93,49	0,78 <sup>ns</sup>
<b>Verapamil</b>							
Injúria 1 DAT							
LONDS4-S	-0,730*	-0,027 <sup>ns</sup>	28,806 <sup>ns</sup>	1146,32	634,72	1657,93	
MARPR9-RN	-1,373*	0,138 <sup>ns</sup>	53,157 <sup>ns</sup>	857,15	-3676,77	5391,08	0,75 <sup>ns</sup>
Injúria 10 DAT							
LONDS4-S	-0,982*	0,150 <sup>ns</sup>	100,000*	78,46	59,15	97,77	
MARPR9-RN	-1,123*	0,428 <sup>ns</sup>	100,000*	140,50	107,16	173,83	1,79*
<b>Putrescina</b>							
Injúria 1 DAT							
LONDS4-S	-0,688*	-0,017 <sup>ns</sup>	33,356 <sup>ns</sup>	1031,13	563,78	1498,48	
MARPR9-RN	-1,291*	0,332 <sup>ns</sup>	53,726*	820,94	728,21	913,68	0,80 <sup>ns</sup>
Injúria 10 DAT							
LONDS4-S	-1,336*	-0,221 <sup>ns</sup>	100,000*	102,45	85,77	119,14	
MARPR9-RN	-1,393*	0,578 <sup>ns</sup>	100,000*	87,37	75,79	98,95	0,85 <sup>ns</sup>

\*significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; C50: dose necessária para controle de 50%. FR: fator de resistência.

O estudo do efeito de inibidores em hidroponia apesar de favorecer a sua absorção pelas plantas e possivelmente otimizar o seu efeito na inibição dos processos, foi prejudicado pela impossibilidade de acompanhar o rebrote das plantas resistentes em resposta ao 2,4-D. Contudo, os resultados observados no atraso do início dos sintomas e redução inicial da injúria no biótipo MARPR9-RN com os inibidores orthovanadato e verapamil, corroboram com o observado nos dois estudos anteriores e no estudo de

Queiroz *et al.* (2022). Enzimas transportadoras do tipo ABC podem estar relacionadas ao mecanismo de resistência ao 2,4-D em *C. sumatrensis*, mas possivelmente não são o fator único. Essa hipótese é considerada porque o estudo completo com inibidores dessas enzimas não observou a reversão total da resistência, mesmo quando avaliados diferentes doses / concentrações e métodos de aplicação dos inibidores nas plantas. Além disso, estudo anterior identificou apenas leve redução na expressão do gene *ABCM10* (ABC-C FAMILY MRP10 - gene transportador ABCD) após o tratamento com 2,4-D nas plantas resistentes desse mesmo biótipo de *C. sumatrensis* (Queiroz *et al.*, 2022). No entanto, não é possível descartar a possibilidade de que outros transportadores do tipo ABC tenham sua atividade alterada na planta e sejam responsáveis por alterações no transporte do herbicida 2,4-D que promovam o fenótipo de resistência. Por outro lado, os inibidores podem apresentar efeito parcial nos transportadores de auxina envolvidos na ocorrência de rápida necrose causada por 2,4-D. Neste caso, o resultado mesmo que parcial do efeito dos inibidores na reversão da sintomatologia associada com a resistência indica a importância dos transportadores ABC como mecanismo de resistência.

#### 3.3.4 Alterações na fotossíntese na ocorrência da rápida necrose

A aplicação dos inibidores do fotossistema II, atrazina e diuron em solução nutritiva não retardou o início da rápida necrose em nenhuma das concentrações avaliadas em relação a aplicação isolada do herbicida (Figura 11A). Os inibidores também não reverteram completamente o fenótipo de rápida necrose nas plantas resistentes, contudo os sintomas foram atenuados (Figura 11B). Quando aplicado isolado o herbicida promoveu injúria aproximada de 74% nas plantas. Porém, a aplicação prévia dos inibidores reduziu significativamente a necrose para faixa de 54 a 58% nas concentrações de 100 e 500  $\mu\text{M}$  de atrazina e de 1000 e 10000 e 2500  $\mu\text{M}$  de diuron (Figura 11B). Esses resultados indicam que alterações na fotossíntese das plantas através da inibição do fotossistema II não impedem a ocorrência dos sintomas relacionados a resistência no biótipo MARPR9-RN. Entretanto, podem afetar a intensidade com que os sintomas se desenvolvem.

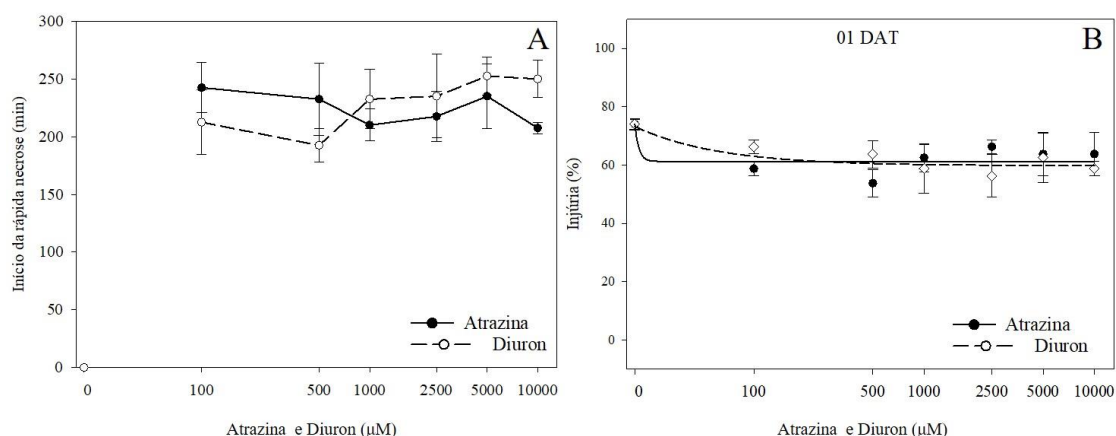


FIGURA 11. Tempo para início dos sintomas (min) (A) após a aplicação de inibidores do fotossistema II atrazina e diuron previamente a aplicação de 2,4-D ( $2000\mu\text{M}$ ) e intensidade de injúria (%) relacionada à rápida necrose 1 dia após o tratamento (DAT) (B) em *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).

No segundo estudo relacionado ao efeito na fotossíntese foram avaliados diferentes tratamentos de presença e ausência de luz na ocorrência dos sintomas relacionados a resistência. O tempo para início da rápida necrose foi afetado pelos tratamentos. Plantas mantidas na ausência de luz após a aplicação do herbicida 2,4-D iniciaram os sintomas de rápida necrose de 134 a 144 min após o tratamento, não diferindo entre as condições de luminosidade as quais foram submetidas antes da aplicação (Figura 12A). O mesmo foi observado para plantas mantidas na presença de luz após a aplicação, nas quais os sintomas iniciaram de 95 a 109 min após o tratamento. Plantas conduzidas na presença de luz e transferidas para condição de escuro após o tratamento com 2,4-D apresentaram início dos sintomas aos 138 min, 30 min mais tarde do que plantas mantidas na condição de luz após a aplicação, nas quais os sintomas foram observados aos 108 min após o tratamento (Figura 12A). Os resultados indicam que apesar de não inibir a ocorrência da rápida necrose, a ausência de luz após a aplicação do herbicida proporciona o início mais tardio dos sintomas em relação a presença de luz.

Quanto ao efeito de alterações na fotossíntese no estresse oxidativo foi observado que a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em discos foliares foi inferior em plantas mantidas na luz antes da aplicação ( $50\%$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em relação aos demais tratamentos (Figura 12B). Porém, a condição de luminosidade após o tratamento com o herbicida não afetou a ocorrência de estresse oxidativo (Figura 13). Ao avaliar a evolução dos sintomas na área foliar de

plantas mantidas sob diferentes condições de luminosidade não foi identificada diferença na área de necrose total logo no início dos sintomas (Figura 12C) e também não com os sintomas já consolidados (Figura 12D) na folha entre plantas submetidas aos diferentes tratamentos. Os resultados desse estudo indicam que a ocorrência do fenótipo de rápida necrose e a produção de  $H_2O_2$  não foram dependentes de luz e ocorreram mesmo na ausência de fotossíntese em plantas resistentes.

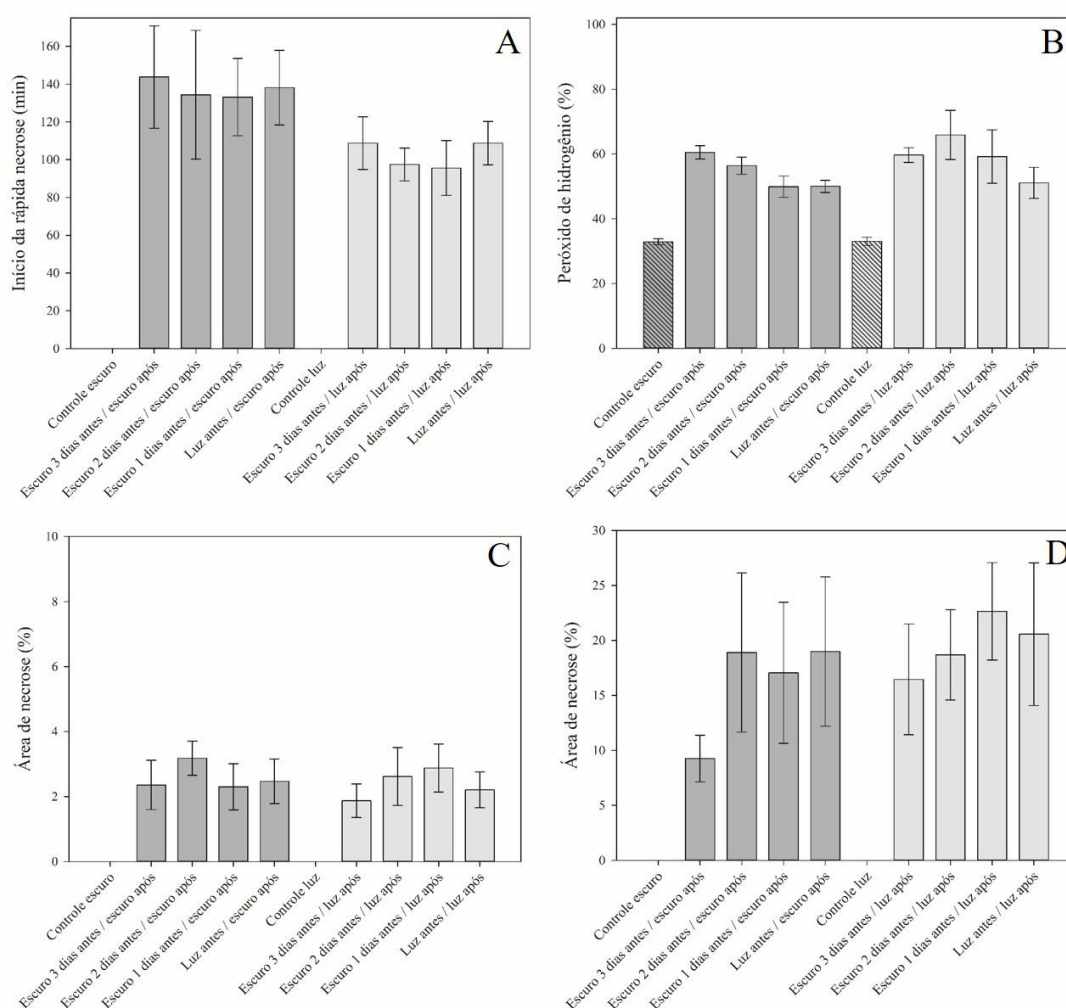


FIGURA 12. Tempo para início dos sintomas (min) (A), acúmulo de peróxido de hidrogênio (%) (B), área de necrose foliar (%) no início dos sintomas (C) e com sintomas consolidados (D) em biótipo de *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D após a aplicação de 2,4-D ( $4,02 \text{ g L}^{-1}$ ) em plantas mantidas em diferentes condições luminosas. Controle escuro: plantas não tratadas mantidas na ausência de luz; Controle luz: plantas não tratadas mantidas na presença de luz ( $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).











Controle escuro		Controle luz	
Escuro 3 dias antes / escuro após		Escuro 3 dias antes / luz após	
Escuro 2 dias antes / escuro após		Escuro 2 dias antes / luz após	
Escuro 1 dias antes / escuro após		Escuro 1 dias antes / luz após	
Luz antes / escuro após		Luz antes / luz após	

FIGURA 13. Presença de peróxido de hidrogênio em discos foliares de *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN) ao 2,4-D avaliada 1,5 horas após aplicação de 2,4-D ( $4,02 \text{ g L}^{-1}$ ) em plantas mantidas em diferentes condições de luminosidade. A coloração marrom dos tecidos indica a presença de estresse oxidativo. Controle escuro: plantas não tratadas mantidas na ausência de luz; Controle luz: plantas não tratadas mantidas na presença de luz ( $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

Resultado semelhante foi observado em estudos anteriores, onde na condição de baixa luminosidade ( $29 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi reduzida em *C. sumatrensis* e ocorreu atraso no início dos sintomas de rápida necrose em comparação a condição de maior intensidade luminosa ( $848 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (Queiroz, 2019). Contudo, a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  não foi dependente da presença de luz nessa espécie e os sintomas também ocorreram na condição de escuro. Biótipo resistente de *C. sumatrensis* apresentou 20% de redução no desempenho fotossintético 1 hora após a aplicação (HAT) do herbicida 2,4-D, afetando negativamente o desempenho da cadeia transportadora de elétrons. Em 4 HAT essas alterações metabólicas também foram observadas no biótipo suscetível. O dano fotossintético foi rapidamente observado no biótipo resistente em comparação ao suscetível devido à resposta fisiológica diferencial ao 2,4-D (Leal *et al.*, 2022).

### 3.4 Conclusões

Os estudos realizados com diferentes inibidores metabólicos avaliados através de diferentes metodologias indicam que o mecanismo de resistência ao herbicida 2,4-D relacionado a rápida necrose em *Conyza sumatrensis* possivelmente não envolve a detoxificação do herbicida por enzimas citocromo P450 monooxigenase e glutathione-S-transferase. Contudo, o efeito de inibidores de transportadores ABC na redução parcial dos sintomas ou no atraso da ocorrência de rápida necrose indica que alterações no transporte transmembrana do 2,4-D podem estar relacionadas com a resistência. Alterações na fotossíntese das plantas resistentes afetam o tempo e a intensidade de resposta ao herbicida 2,4-D, mas não condicionam a ocorrência da resistência.



### 3.5 Referências

- ANWAR, R.; MATTOO, A. K.; HANDA, A. K. Polyamine interactions with plant hormones: crosstalk at several levels. *In: KUSANO, T.; SUZUKI, H. (ed.). Polyamines*. Tokyo: Springer, 2015. p. 267-302.
- AVER'YANOV, A. A. *et al.* Inhibitors of antioxidant enzymes systemically protect cucumber plants from scab. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 66, p. 932-941, 2019.
- BESTWICK, C. S. *et al.* Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 209-221, 1997.
- BRABHAM, C. B.; GERBER, C. K.; JOHNSON, W. G. Fate of glyphosate-resistant giant ragweed (*Ambrosia trifida*) in the presence and absence of glyphosate. **Weed Science**, Champaign, v. 59, n. 4, p. 506-511, 2011.
- BRUNHARO, C.; HANSON, B. Vacuolar sequestration of paraquat is involved in the resistance mechanism in *Lolium perenne* L. spp. *multiflorum*. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, n. 1485, p. 1-9, 2017.
- BUSI, R. *et al.* Weed resistance to synthetic auxin herbicides. **Pest Management Science**, Malden, v. 74, n. 10, p. 2265-2276, 2018.
- FERRONI, L. *et al.* In an ancient vascular plant the intermediate relaxing component of NPQ depends on a reduced stroma: evidence from dithiothreitol treatment. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, New York, v. 215, [art.] 112114, [p. 1-11], 2021.
- FIGUEIREDO, M. R. *et al.* Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid contributes to resistance in a common waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) population. **Pest Management Science**, Malden, v. 74, n. 10, p. 2356-2362, 2018.
- FIGUEIREDO, M. R. A. *et al.* 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**, Washington, DC, v. 119, n. 9, [art.] e2105819119, 2022.
- GAINES, T. A. The quick and the dead: a new model for the essential role of ABA accumulation in synthetic auxin herbicide mode of action. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 71, n. 12, p. 3383-3385, 2020.
- GE, X. *et al.* In vivo <sup>31</sup>P-nuclear magnetic resonance studies of glyphosate uptake, vacuolar sequestration, and tonoplast pump activity in glyphosate-resistant horseweed. **Plant Physiology**, Rockville, v. 166, p. 1255-1268, 2014.
- GEISLER, M.; MURPHY, A. S. The ABC of auxin transport: the role of p-

glycoproteins in plant development. **FEBS Letters**, West Sussex, v. 580, p. 1094-1102, 2005.

GEISLER, M. M. A retro-perspective on auxin transport. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 12, [art.] 756968, [p. 1-12], 2021.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 5, p. 26-33, 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**, Oxford, v. 67, n. 11, p. 3223-3235, 2016.

GOGGIN, D. E. *et al.* Plasma membrane receptor-like kinases and transporters are associated with 2,4-D resistance in wild radish. **Annals of Botany**, Oxford, v. 125, p. 821-832, 2020.

GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, A. I. *et al.* Putrescine: a key metabolite involved in plant development, tolerance and resistance responses to stress. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 23, n. 6, [art.] 2971, [p. 1-23], 2022.

GROSSMANN, K. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. **Pest Management Science**, Malden, v. 66, n. 2, p. 113-120, 2010.

GROSSMANN, K. Mediation of herbicide effects by hormone interactions. **Journal of Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 22, p. 109-122, 2003.

HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. **Plant Molecular Biology**, Waltham, v. 49, n. 3/4, p. 373-385, 2002.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: College of Agriculture, University of California, 1950. (Circular, 347).

ITO, H.; GRAY, W. M. A Gain-of-Function mutation in the *Arabidopsis* pleiotropic drug resistance transporter PDR9 confers resistance to auxinic herbicides. **Plant Physiology**, Rockville, v. 142, p. 63-74, 2006.

KUBES, M.; NAPIER, R. Non-canonical auxin signaling: fast and curious. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 70, n. 10, p. 2609-2614, 2019.

LEAL, J. F. L. *et al.* Rapid photosynthetic and physiological response of 2,4-D-resistant Sumatran fleabane (*Conyza sumatrensis*) to 2,4-D as a survival strategy. **Weed Science**, Champaign, v. 70, n. 3, p. 298-308, 2022.

LECLERE, S. *et al.* 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**, Washington, DC, v. 115, p. 2911-2920, 2018.

- MCCAULEY, C. L. *et al.* Transcriptomics in *Erigeron canadensis* reveals rapid photosynthetic and hormonal responses to auxin-herbicide application. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 71, n. 12, p. 3701-3709, 2020.
- OROZCO-CARDENAS, M. L.; NARVAEZ-VASQUEZ, J.; RYAN, C. A. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. **Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 179-191, 2001.
- PETERSON, M. A. *et al.* 2,4-D past, present, and future: a review. **Weed Technology**, Champaign, v. 30, p. 303-345, 2016.
- PETERSSON, S. V. *et al.* An auxin gradient and maximum in the Arabidopsis root apex shown by high resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. **Plant Cell**, Rockville, v. 21, p. 1659-1668, 2009.
- QUEIROZ, A. R. S. **Caracterização da resistência ao herbicida 2,4-D em *Conyza sumatrensis* associada à rápida necrose**. 2019. Tese (Doutorado) - Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.
- QUEIROZ, A. R. S. *et al.* Rapid necrosis: a novel plant resistance mechanism to 2,4-D. **Weed Science**, Champaign, v. 68, n. 1, p. 6-18, 2020.
- QUEIROZ, A. R. S. *et al.* Rapid necrosis II: physiological and molecular analysis of 2,4-D resistance in Sumatran fleabane (*Conyza sumatrensis*). **Weed Science**, Champaign, v. 70, n. 1, p. 36-45, 2022.
- SEZGIN, A. *et al.* Abscisic acid cross-talking with hydrogen peroxide and osmolyte compounds may regulate the leaf rolling mechanism under drought. **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin, v. 40, [art.] 141, 2018.
- SRIVASTAVA, A. K.; SINGH, D. Assessment of malathion toxicity on cytophysiological activity, DNA damage and antioxidant enzymes in root of *Allium cepa* model. **Scientific Reports**, London, v. 10, [art.] 886, 2020.
- SONG, Y. Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. **Journal of Integrative Plant Biology**, Hoboken, v. 56, n. 2, p. 106-113, 2014.
- TAN, X. *et al.* Mechanism of auxin perception by the TIR1ubiquitin ligase. **Nature**, London, v. 446, p. 640-645, 2007.
- THORDAL-CHRISTENSEN, H.; ZHANG, Z.; WEI, Y. C. D. Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. **The Plant Journal**, Oxford, v. 11, p. 1187-1194, 1997.

- TODD, O. E. *et al.* Synthetic auxin herbicides: finding the lock and key to weed resistance. **Plant Science**, Shannon, v. 300, [art.] 110631, [p. 1-8], 2020.
- TORRA, J. *et al.* Cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance to imazamox and 2,4-D in *Papaver rhoeas*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 160, p. 51-61, 2021.
- VILLALOBOS, L. I. A. C. *et al.* A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. **Nature Chemical Biology**, London, v. 8, n. 5, p. 477-485, 2012.
- WRIGHT, A. A. *et al.* Characterization of fenoxaprop-P-ethyl-resistant junglerice (*Echinochloa colona*) from Mississippi. **Weed Science**, Champaign, v. 64, p. 588-595, 2016.
- YANG, W. *et al.* Rutin-mediated priming of plant resistance to three bacterial pathogens initiating the early SA signal pathway. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 1, [art.] e0146910, [p. 1-15], 2016.
- YE, B. *et al.* Constitutively elevated levels of putrescine and putrescine-generating enzymes correlated with oxidant stress resistance in *Conyza bonariensis* and wheat. **Plant Physiology**, Rockville, v. 115, p. 1443-1451, 1997.

## **4 CAPÍTULO 2**

**Sintomatologia do herbicida 2,4-D em plantas resistentes por rápida necrose e  
avaliação da expressão diferencial de genes através de RNA Seq**

## SINTOMATOLOGIA DO HERBICIDA 2,4-D EM PLANTAS RESISTENTES POR RÁPIDA NECROSE E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES ATRAVÉS DE RNA Seq

### RESUMO

Plantas de buva (*Conyza sumatrensis*) resistentes ao 2,4-D apresentam sintomas atípicos de rápida necrose foliar após o tratamento com o herbicida ao invés dos sintomas característicos de epinastia observados em plantas suscetíveis. Os objetivos desse estudo foram desenvolver uma metodologia de amostragem do tecido vegetal relacionada a dinâmica de ocorrência da rápida necrose associada a resistência ao 2,4-D em buva, e avaliar a expressão diferencial de genes envolvidos com a ocorrência desses sintomas através de RNA Seq. Foram realizados cinco estudos para caracterização da sintomatologia da rápida necrose, os quais indicaram estabilidade e consistência através da amostragem de discos foliares de 11 mm de diâmetro coletados de plantas resistentes e suscetíveis em 5, 30 e 60 min após o tratamento com quatro gotas de 2,4-D ( $8,04 \text{ g L}^{-1}$ ), mantidas em condição de  $25^\circ\text{C}$  e luminosidade de  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . A análise da expressão diferencial de genes em resposta ao herbicida 2,4-D em comparação com a condição controle revelou que o efeito inicial do herbicida em plantas suscetíveis é mais intenso na repressão da expressão gênica, enquanto que em plantas resistentes o 2,4-D causou aumento da expressão gênica ao longo do tempo. A sobreposição dos genes diferencialmente expressos nas combinações de todos os tratamentos com o herbicida 2,4-D entre plantas resistentes e suscetíveis proporcionou a identificação de 104 genes envolvidos apenas nas primeiras sinalizações da resposta de resistência aos 5 min, 20 genes envolvidos nas sinalizações iniciais e intermediárias aos 5 e 30 min e dois genes associados a todas as etapas de sinalização da resistência avaliadas (5, 30 e 60 min). A sinalização inicial da resposta de rápida necrose envolve o aumento da expressão de genes associados à resposta de defesa da planta a estresses após o tratamento com 2,4-D. O gene *PATATIN-LIKE PROTEIN 2 (PLP2)* envolvido nas rotas de metabolismo de drogas e de glicerolipídeos foi identificado em todas as etapas de resposta da resistência avaliadas. Genes que codificam transportadores *PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE PROTEIN 1 (PDR1)* e *ATP BINDING CASSETTE SUBFAMILY (ABCB4 e ABCB12)* foram expressos aos 60 min nas plantas resistentes. Em conjunto, os resultados indicam que a resposta de rápida necrose das plantas resistentes ao 2,4-D envolve diferentes processos que são desencadeados em sequência após a aplicação do herbicida. Possivelmente, a resposta inicia com a percepção do 2,4-D como um elicitor patogênico, induzindo os genes de defesa que promovem a rápida morte celular dos tecidos. Após, a maior atividade de transportadores PDR1, ABCB4 e ABCB12 pode resultar no aumento do transporte do herbicida a partir do meristema e proporcionar a retomada do crescimento da planta. Estudos de validação dos genes diferencialmente expressos encontrados são necessários para confirmar a sua importância no mecanismo associado com a rápida necrose causada por 2,4-D em buva.

## 4.1 Introdução

As espécies do gênero *Conyza* estão entre as principais plantas daninhas dos cultivos agrícolas (Dan *et al.*, 2013). O controle dessas plantas é dificultado principalmente pela evolução da resistência a herbicidas inibidores dos fotossistemas I e II, da enzima 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase (EPSPS) e da enzima acetolactato sintase (ALS) (Santos *et al.*, 2014). Assim, as principais alternativas para o controle dessas espécies são os herbicidas auxínicos 2,4-D e dicamba (Soares *et al.*, 2012). Contudo, recentemente foi identificado no Brasil o primeiro caso de resistência ao 2,4-D em biótipo de *Conyza sumatrensis* (Queiroz *et al.*, 2020), além de resistência múltipla a herbicidas de outros quatro mecanismos de ação (diuron, paraquat, glifosato e saflufenacil) (Pinho *et al.*, 2019).

Biótipos de *C. sumatrensis* resistentes ao herbicida 2,4-D por rápida necrose foram identificados no Brasil em 2015. Essas plantas desenvolvem um fenótipo atípico de necrose dos tecidos foliares em decorrência da aplicação do 2,4-D. Os sintomas são observados cerca de 2 h após a aplicação do herbicida e a planta retoma o crescimento a partir das gemas axilares (Queiroz *et al.*, 2020). Não existe relato na literatura de casos semelhantes de resistência a herbicidas auxínicos para outras espécies (Torra *et al.*, 2021; Figueiredo *et al.*, 2022). Porém, fenótipo similar de rápida necrose foliar foi descrito em *Ambrosia trifida* resistente ao herbicida glifosato (Brabham *et al.*, 2011). Esse novo mecanismo de resistência em plantas daninhas por rápida necrose ainda não é conhecido e os genes e rotas metabólicas envolvidos não foram descritos para nenhuma das duas espécies em que a resistência foi identificada.

Nas plantas de *C. sumatrensis* os sintomas de 2,4-D foram observados apenas em folhas maduras, sem ocorrência em meristemas e folhas jovens. A resistência por rápida necrose ocorre apenas para os herbicidas auxínicos 2,4-D e MCPA do grupo dos ácidos fenoxicarboxílicos. Os sintomas não ocorreram com outros herbicidas auxínicos ou glifosato. Nas plantas resistentes foi observada elevada produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) aos 15 minutos após a aplicação do herbicida (Queiroz *et al.*, 2020). Além disso, a resposta de rápida necrose das plantas foi afetada pelas condições ambientais. Plantas resistentes mantidas em baixa luminosidade ( $29 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ou baixa temperatura ( $12^\circ\text{C}$ ) apresentaram produção de  $H_2O_2$  reduzida e atraso no início dos sintomas em comparação com plantas mantidas em condição de maior intensidade

luminosa ( $848 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ou temperatura ( $30^\circ\text{C}$ ) (Queiroz, 2019; Queiroz *et al.*, 2020). Entretanto, a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  após a aplicação de 2,4-D não foi dependente da presença de luz e ocorreu mesmo na condição de escuro em plantas resistentes (Leal *et al.*, 2022).

O estresse oxidativo de discos foliares do biótipo resistente ao 2,4-D foi reduzido parcialmente quando os inibidores do transporte de auxinas, orthovanadato e azida sódica foram aplicados previamente ao herbicida. Contudo, o fenótipo de rápida necrose não foi revertido com a aspersão foliar desses inibidores ou inibidores de enzimas de detoxificação (Queiroz *et al.*, 2022). Outro estudo identificou que a atividade basal das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase foi superior nas plantas resistentes em comparação com as suscetíveis, apesar de não diferir entre plantas resistentes não tratadas e tratadas com o herbicida (Leal *et al.*, 2022). A expressão de genes *ABCM10* (*ABC-C FAMILY MRP10* - transportador ABCD), *TIR1\_1* (*TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1* - receptor de auxinas), *CALS1* (*CALLOSE SYNTHASE 1* - biossíntese de calose) e *CAT4* (*CATIONIC AMINO ACID TRANSPORTER 4* - transportador de aminoácidos) foi rapidamente reduzida após o tratamento com 2,4-D nas plantas resistentes. E a expressão do gene *LSD1\_3* (*LESION SIMULATING DISEASE 1* - resposta a estresses) aumentou após a aplicação do herbicida (Queiroz *et al.*, 2022). Esses resultados indicam que o mecanismo de rápida necrose provavelmente não está relacionado à detoxificação do herbicida 2,4-D por enzimas citocromo P450 monooxigenases (cytP450) e glutatona S transferase (GST), mas pode envolver alterações no transporte de auxinas ou no receptor TIR1. Ainda, os efeitos das enzimas superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase podem estar associados as consequências do estresse oxidativo relacionado a rápida necrose e não com a causa do mecanismo de resistência.

Estudos complementares de sequenciamento de RNA (RNA Seq) de plantas resistentes e suscetíveis, tratadas e não tratadas, podem contribuir para identificação do mecanismo de resistência por rápida necrose em *C. sumatrensis*. Essa técnica tem sido utilizada na investigação do mecanismo de resistência a herbicidas em plantas daninhas pela capacidade de revelar a expressão de genes e fornecer comparações do transcriptoma inteiro entre plantas suscetíveis e resistentes (Gaines *et al.*, 2014; Duhoux *et al.*, 2017). A expressão de um gene em resposta a um estímulo corresponde a um curto intervalo de tempo no organismo. Portanto, o momento e as condições de amostragem do tecido vegetal devem ser bem estabelecidos para representar com precisão o transcriptoma do



organismo sob a condição experimental amostrada para efetiva identificação dos genes candidatos (Matsuda, 2021). Estes processos são ainda mais importantes em relação a ocorrência de rápida necrose, pois, o sintoma ocorre rapidamente e é caracterizado pela ocorrência direta de necrose do tecido foliar. Desta forma, compostos relacionados a espécies reativas de oxigênio são produzidos rapidamente, o que pode causar confundimento com os mecanismos de causa da resistência. A ocorrência localizada dos sintomas de rápida necrose na planta e a variação de resposta em função das características do ambiente (Leal *et al.*, 2022; Queiroz *et al.*, 2020) tornam fundamental a padronização das condições de amostragem do material com resultados prévios que confirmem a evolução da sintomatologia na determinada condição.

Os objetivos deste estudo foram desenvolver metodologia de amostragem de tecido vegetal relacionada a evolução da sintomatologia de rápida necrose causada por 2,4-D em buva e avaliar a expressão diferencial de genes associados com a ocorrência desse fenótipo através de RNA Seq.

## 4.2 Material e Métodos

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação climatizada e em câmaras de crescimento do Departamento de Plantas de Lavoura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em Porto Alegre/RS.

### 4.2.1 Material vegetal e condições de crescimento

Os experimentos foram realizados com os biótipos de *C. sumatrensis* LONDS4-S, suscetível ao herbicida auxínico 2,4-D, e MARPR9-RN caracterizado em estudo anterior como resistente a 2,4-D com a ocorrência de rápida necrose (Queiroz *et al.*, 2020). A semeadura dos biótipos foi realizada em bandejas plásticas com dimensão de 15 cm (C) x 15 cm (L) x 10 cm (A), preenchidas com substrato comercial a base de turfa e casca de arroz torrefada (Carolina Soil®). As bandejas foram mantidas em casa de vegetação climatizada com temperatura média de  $28^{\circ}\text{C} \pm 3$  e irrigação diária para promover a germinação das sementes. Quando as plântulas estavam no estágio de quatro a cinco folhas imaturas foram transplantadas para vasos plásticos individuais com capacidade de 200 mL. Os vasos foram previamente preenchidos com substrato na proporção 1:1, solo

(Argissolo Vermelho) : substrato comercial, e 5 g de NPK (14-16-18) para cada 1 kg de substrato. Os vasos foram mantidos em bandejas plásticas com lâmina d'água de aproximadamente 2 cm. As plantas foram conduzidas em casa de vegetação climatizada e câmara de crescimento (BDR16 Conviron) com condições de temperatura e fotoperíodo conforme descrito para cada experimento.

#### 4.2.2 Sintomatologia do herbicida e definição das condições de amostragem

O estudo do padrão de sintomatologia do herbicida 2,4-D em plantas de buva resistentes por rápida necrose foi constituído por cinco experimentos (Tabela 1), nos quais foi avaliada a influência dos fatores tempo de amostragem, número de gotas, concentração do herbicida e temperatura ambiente na evolução da produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e dos sintomas visuais de rápida necrose, e tratamento com o herbicida picloram. A partir dos resultados desse estudo foram definidos os tratamentos e as condições de amostragem do material vegetal para sequenciamento (RNA Seq). Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com quatro repetições.

TABELA 1. Experimentos para estudo do padrão de sintomatologia do herbicida 2,4-D.

<b>Número</b>	<b>Experimento</b>	<b>Fator principal avaliado</b>
<b>1</b>	Evolução no tempo do estresse oxidativo após a aspersão do herbicida 2,4-D	Tempo de amostragem
<b>2</b>	Evolução do estresse oxidativo e da área total de necrose após a aplicação localizada de gotas do herbicida 2,4-D no tecido foliar	Número de gotas
<b>3</b>	Evolução do estresse oxidativo e da área total de necrose em função da concentração do herbicida 2,4-D	Concentração do herbicida
<b>4</b>	Evolução do estresse oxidativo e da área total de necrose em função da temperatura ambiente	Temperatura ambiente
<b>5</b>	Avaliação da resposta de suscetibilidade em função da concentração do herbicida picloram	Herbicida picloram

O primeiro experimento avaliou a evolução no tempo do estresse oxidativo após a aspersão do herbicida 2,4-D. O fator A foi composto pelos biótipos MARPR9-RN e LONDS4-S. O fator B foi o herbicida 2,4-D na dose de  $1608 \text{ g ha}^{-1}$  (DMA<sup>®</sup> 806 BR SL). E o fator C foram os tempos de amostragem antes, 1, 15, 30, 60, 90, 120 e 200 min após a aplicação do herbicida. As plantas foram inicialmente conduzidas em casa de vegetação climatizada com temperatura média de  $28^{\circ}\text{C} \pm 3$ . Plantas no estágio de 6-8 folhas foram transferidas 24 h antes da aplicação para câmara de crescimento (BDR16 Conviron) com temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ , 13 h de fotoperíodo e luminosidade de  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . A aspersão do herbicida foi realizada em câmara de aplicação automatizada (Greenhouse Spray Chamber, modelo Generation III), com ponta de pulverização TJ8002E e volume de calda de  $200 \text{ L ha}^{-1}$ . Discos foliares de 11 mm de diâmetro foram coletados de folhas do médio-ápice das plantas antes da aplicação e nos intervalos antes, 1, 15, 30, 60, 90, 120 e 200 min após a aplicação do herbicida. Após a coleta os discos foliares foram incubados em solução com DAB ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , pH 3,8) à temperatura ambiente por oito horas.

O segundo experimento avaliou a evolução do estresse oxidativo e da área total de necrose após a aplicação localizada de gotas do herbicida 2,4-D no tecido foliar. O fator A foi composto pelos biótipos MARPR9-RN e LONDS4-S. O fator B foi a aplicação de 1, 2, 4 e 8 gotas do herbicida 2,4-D na concentração de  $8,04 \text{ g L}^{-1}$  (DMA<sup>®</sup> 806 BR SL). As plantas foram conduzidas conforme descrito no experimento anterior. A aplicação do herbicida foi realizada com micropipeta de 2-20 $\mu\text{L}$ . O volume de cada gota correspondeu a aproximadamente  $0,65\mu\text{L}$ , menor volume proporcionado pela micropipeta, na qual foram obtidas 3 gotas em  $2\mu\text{L}$  de calda. Discos foliares de 11 mm de diâmetro foram coletados do local de aplicação do herbicida nas folhas nos intervalos de 1, 15, 30, 60 e 120 min após a aplicação. Após a coleta os discos foliares foram incubados em solução com DAB ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , pH 3,8) à temperatura ambiente por oito horas. As plantas foram fotografadas 5 e 24 h após a aplicação dos tratamentos e a área de necrose de quatro folhas por tratamento foi mensurada no programa ImageJ.

O terceiro experimento avaliou a evolução do estresse oxidativo e da área total de necrose em função da concentração do herbicida 2,4-D. O fator A foi composto pelos biótipos MARPR9-RN e LONDS4-S. O fator B foram as concentrações de 0; 0,80; 1,89; 2,97 e  $4,02 \text{ g L}^{-1}$  do herbicida 2,4-D (DMA<sup>®</sup> 806 BR SL). As plantas foram conduzidas de acordo com o descrito para o primeiro experimento. Conforme definido pelos resultados do experimento anterior, foram aplicadas quatro gotas do herbicida com

micropipeta por folha amostrada. Discos foliares de 11 mm de diâmetro foram coletados do local de aplicação do herbicida nas folhas nos intervalos de 1, 5, 10, 15, 20 e 25 min após a aplicação. Após a coleta os discos foliares foram incubados em solução com DAB ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , pH 3,8) à temperatura ambiente por oito horas. As plantas foram fotografadas 2 e 5 h após a aplicação dos tratamentos e a área de necrose de quatro folhas por tratamento foi mensurada no programa ImageJ.

O quarto experimento avaliou a evolução do estresse oxidativo e da área total de necrose no biótipo MARPR9-RN em função da temperatura ambiente. O fator A foi composto pelas temperaturas de 15, 20 e 25°C. O fator B foram as concentrações de 0, 2,01; 4,02 e 8,04  $\text{g L}^{-1}$  do herbicida 2,4-D (DMA<sup>®</sup> 806 BR SL). As plantas foram conduzidas conforme descrito para o primeiro experimento. Conforme definido pelos resultados do segundo experimento, foram aplicadas quatro gotas do herbicida com micropipeta por folha amostrada. Discos foliares de 11 mm de diâmetro foram coletados do local de aplicação do herbicida nas folhas nos intervalos de 1, 5, 10, 15, 20 e 25 min após a aplicação. Após a coleta os discos foliares foram incubados em solução com DAB ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , pH 3,8) à temperatura ambiente por oito horas. As plantas foram fotografadas 2, 5 e 24 h após a aplicação dos tratamentos e a área de necrose de quatro folhas por tratamento foi mensurada no programa ImageJ.

O quinto experimento foi realizado com o herbicida auxínico picloram para definição de um tratamento comparativo para o estudo de RNA seq. O picloram foi selecionado para esse estudo para avaliar a resposta padrão de suscetibilidade do biótipo MARPR9-RN a um herbicida auxínico que não cause rápida necrose. O biótipo utilizado foi caracterizado anteriormente como suscetível a esse herbicida (Queiroz *et al*, 2020). A partir dos resultados do segundo experimento realizado com 2,4-D foi avaliado o efeito da aplicação localizada de quatro gotas do herbicida picloram no tecido foliar dos biótipos MARPR9-RN e LONDS4-S. O herbicida foi aplicado na concentração 2,40  $\text{g L}^{-1}$  de picloram (Padron<sup>®</sup> SL). O restante do experimento foi conduzido conforme descrito anteriormente para o 2,4-D. Da mesma forma, foi avaliado o efeito de concentrações do herbicida picloram nos biótipos MARPR9-RN e LONDS4-S. As concentrações avaliadas foram 0; 0,24; 1,20; 2,40; 4,80  $\text{g L}^{-1}$  de picloram (Padron<sup>®</sup> SL).

Em todos os experimentos foi avaliada a produção de peróxido de hidrogênio pelo método de coloração com hidrocloreto de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Thordal-Christensen *et al.*, 1997). Após a incubação os discos foliares foram descorados com a

remoção da clorofila por aquecimento até fervura em etanol 90% por 10 min. Em seguida, os discos foliares foram fotografados e a presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> visualizada pela coloração marrom nos tecidos onde o DAB polimerizou o composto. As imagens foram analisadas no programa ImageJ no qual foi obtida a fração dos discos foliares com coloração associada a testemunha não tratada (coloração amarelo claro dos tecidos) e a ocorrência de sintomas de rápida necrose (coloração marrom).

A análise de dados foi realizada no software estatístico R v.3.6.3. Os dados obtidos em todos os experimentos foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e à análise de variância (ANOVA  $p \leq 0,05$ ) usando o pacote *Expdes.pt*. Quando a análise foi significativa realizou-se teste de comparação de médias (Tukey,  $p \leq 0,05$ ) para os experimentos com fatores qualitativos. Quando foi verificada a interação nos experimentos que avaliaram o fator dose / concentração dos inibidores ou do herbicida foi realizada análise de regressão usando o pacote *drc*, com ajuste dos dados pelo modelo não-linear log-logístico de quatro parâmetros:  $y = (y_0 + a) * ((x/x_0)^b) / (1 + (x/x_0)^b)$ . Os gráficos foram elaborados no software SigmaPlot v.14.0.

#### 4.2.3 Avaliação da expressão diferencial de genes através de RNA Seq

##### 4.2.3.1 Tratamentos e condições de amostragem

As etapas realizadas para avaliação da expressão diferencial de genes através do RNA Seq estão descritas na Figura 1. Conforme os resultados obtidos no estudo anterior foram definidos os oito tratamentos (Tabela 2) e as condições de amostragem para RNA Seq. Plantas no estágio de 6-8 folhas foram transferidas de casa de vegetação para câmara de crescimento (BDR16 Conviron) com temperatura de 25°C, 13 h de fotoperíodo e luminosidade de 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  48 h antes da aplicação dos tratamentos. Os tratamentos consistiram na aplicação dos herbicidas 2,4-D e picloram nos biótipos MARPR9-RN e LONDS4-S e coleta do material vegetal 5, 30 e 60 min após a aplicação, conforme descrito na Tabela 2. A aplicação dos herbicidas foi realizada com micropipeta, sendo aplicadas quatro gotas de 0,65  $\mu\text{l}$  por folha nas concentrações de 8,04 e 2,40  $\text{g L}^{-1}$  de 2,4-D e picloram, respectivamente. No tempo de amostragem correspondente a cada tratamento foi realizada a coleta dos discos foliares da área tratada e imediata armazenagem em nitrogênio líquido para posterior extração. Para cada tratamento foram

coletadas seis repetições. Cada amostra foi composta por seis discos foliares de 11 mm de diâmetro, sendo coletados dois discos de cada planta, totalizando aproximadamente 100 mg de tecido por amostra.

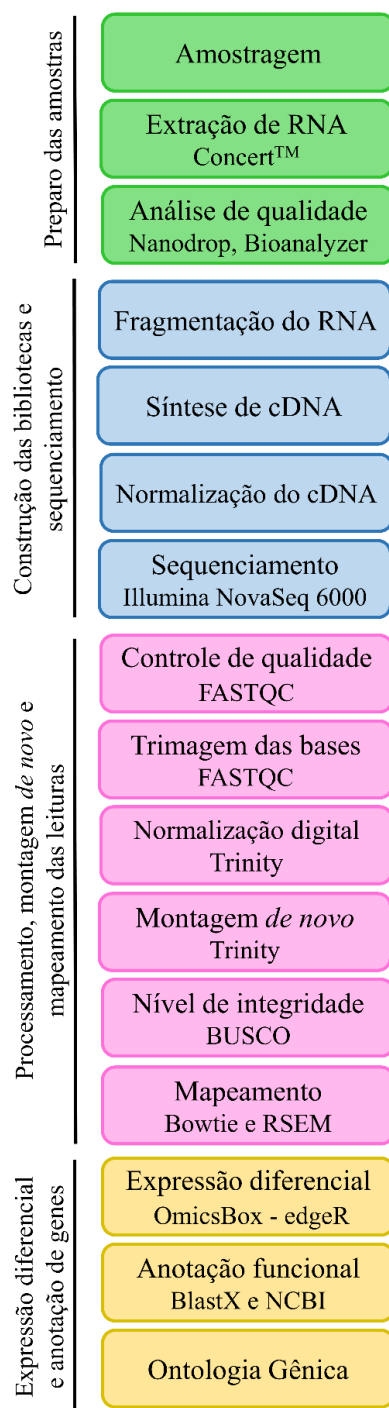


FIGURA 1. Fluxograma das etapas realizadas para avaliação da expressão diferencial de genes através do RNA Seq.

TABELA 2. Tratamentos para RNA Seq.

Tratamento	Biótipo	Herbicida	Concentração (g ea L <sup>-1</sup> )	Tempo coleta após aplicação (min)
T1	MARPR9-RN	2,4-D	8,04	5
T2	MARPR9-RN	controle	0	30
T3	MARPR9-RN	2,4-D	8,04	30
T4	MARPR9-RN	2,4-D	8,04	60
T5	MARPR9-RN	picloram	2,40	30
T6	LONDS4-S	controle	0	30
T7	LONDS4-S	2,4-D	8,04	30
T8	LONDS4-S	2,4-D	8,04	60

#### 4.2.3.2 Extração e purificação de RNA

Para cada tratamento foram utilizadas três repetições. O RNA total foi extraído por meio da maceração das amostras de material vegetal em nitrogênio líquido e posterior adição do reagente Concert™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA), conforme protocolo do fabricante. Posteriormente, as amostras de RNA total foram purificadas com a enzima DNase® I (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA), conforme protocolo do fabricante. A concentração de RNA total e a razão de absorvância 260/280 foram verificadas em Nanodrop™ (Thermo Fisher Scientific, USA). A qualidade do RNA foi confirmada em gel de agarose a 1% pela distinção das bandas de RNA e ausência da banda de DNA. Amostras com razão de absorvância 260/280 superior a 2,0 foram consideradas adequadas para sequenciamento, pois indicam ausência de proteínas, fenóis ou outros contaminantes. Todas as amostras foram uniformizadas para concentração de 100 ng/μl e volume de 50 μl. O número de integridade (RIN) das amostras foi avaliado em Bioanalyzer (Agilent 2100 System) pelo laboratório Novogene (8801 Folsom Blvd, Suite 290, Sacramento, CA 95826, Estados Unidos). Amostras com RIN superior a 4,8 foram consideradas adequadas para sequenciamento.

#### 4.2.3.3 Construção das bibliotecas de cDNA e sequenciamento de RNAm

A construção das bibliotecas e o sequenciamento das amostras de RNA foram realizados pelo laboratório Novogene. Para a construção das bibliotecas de cDNA, o RNAm foi purificado a partir das amostras de RNA total com esferas magnéticas poli-T

oligo-ligadas. Após a fragmentação, o cDNA da primeira fita foi sintetizado com primers hexâmeros aleatórios seguidos pela síntese de cDNA da segunda fita (transcrição reversa). Por fim, foram realizados reparo final da sequência, adição de *Poly(A) Tailing*, ligação do adaptador, seleção de tamanho dos fragmentos, amplificação e purificação da sequência. Todas as etapas foram acompanhadas por controle de qualidade das amostras. As bibliotecas de cDNA foram sequenciadas na plataforma Illumina NovaSeq 6000, com estratégia de sequenciamento de 150 pb de extremidade pareada.

#### 4.2.3.4 Processamento das leituras, montagem de novo e mapeamento

A partir do sequenciamento foi realizado o controle de qualidade inicial das leituras brutas com o programa FASTQC (Babraham Bioinformatics; [www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/)). Nessa etapa os pares de arquivo FASTQ para cada biblioteca foram descompactados e seus conteúdos agrupados em um único arquivo para realizar a análise no FASTQC. Na sequência foi realizada a trimagem inicial das bases de todas as leituras. Nesse processo ocorre a limpeza das sequências produzidas pelo sequenciamento, através da remoção de regiões com baixa qualidade ou indesejadas por causarem incidência de erros nas análises dos dados. Os primeiros 15 nucleotídeos de todas as leituras foram removidos com *fastx\_trimmer* pertencente ao pacote FASTX Toolkit para remover o desvio do conteúdo GC (conteúdo de guanina-citosina) no início das leituras (Hansen *et al.*, 2010). Após a trimagem das primeiras 15 bases, novamente foi realizado o controle de qualidade com FASTQC para observar a eficiência da filtragem das leituras.

A normalização digital foi realizada para aumentar a eficiência da montagem através da redução de leituras redundantes nos dados (Tulin *et al.*, 2013). Esta etapa foi realizada com o protocolo de normalização digital de Brown *et al.* (2012) que está incorporado ao programa Trinity versão 2.3.2 (Grabherr *et al.*, 2011), mantendo cobertura máxima de 50 vezes para cada trecho de sequência. Para a normalização das leituras foi utilizado o programa *insilico\_read\_normalization.pl*, pertencente ao pacote do Trinity. A montagem *de novo* foi realizada utilizando todas as bibliotecas normalizadas anteriormente para gerar um transcriptoma de referência. Essa montagem foi executada com Trinity v2.13.2 na plataforma OmicsBox v2.0.36.



A completude dos transcriptomas, ou seja, o nível de integridade dos conjuntos, foi avaliada com o programa BUSCO v5 (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs) e o banco de dados OrthoDB v10 selecionando o grupo de Viridiplantae para pesquisa (Seppey *et al.*, 2019). Os resultados foram categorizados como 'completo - cópia única', 'completo - cópia duplicada', 'fragmentado' ou 'ausente', dependendo do comprimento da sequência alinhada. A partir do transcriptoma de referência montado foram realizados o mapeamento e a quantificação em nível gênico de todas as leituras com os programas Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012) e RSEM (Li & Dewey, 2011) dentro da plataforma do OmicsBox.

#### 4.2.3.5 Análise de expressão diferencial de genes e anotação funcional

A expressão diferencial de genes foi verificada com o pacote edgeR no OmicsBox (Robinson *et al.*, 2010), com o método de normalização TMM (Trimmed Mean of M-values) ajustando os valores de expressão para uma escala comum. Os níveis de expressão dos genes foram calculados usando CPM (*counts-per-million*). Os genes diferencialmente expressos (DEGs - *differentially expressed genes*) foram identificados em transcritos que mostraram diferenças de expressão com corte de  $\log_2$  fold change ( $\log_2$  FC) maior que 2 (*up* regulados ou mais expressos) ou menor que 2 (*down* regulados ou menos expressos) e com *false-discovery rate* (FDR < 0,05). A anotação dos DEGs para todas as comparações foi realizada com corte de E-value 1e-05 na plataforma OmicsBox com BlastX contra o banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

O mapeamento de termos de Ontologia Gênica (GO) foi realizado para processo biológico, função molecular e componente celular. Nessa análise foram identificados os domínios, sítios, famílias e repetições das proteínas com todas as bases de dados que compõem o InterPro. As enzimas foram identificadas através de seu Código Enzimático (*EC number*). O Diagrama de Venn foi gerado com a ferramenta *Calculate and draw custom Venn diagrams* (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) para indicar a sobreposição de genes expressos entre os diferentes tratamentos.

De forma complementar a essas análises, foi realizada a busca da sequência de 15 genes de interesse selecionados na literatura (Tabela 3) no transcriptoma de referência montado nesse estudo. Para isso o transcriptoma de referência foi usado como base de

dados com BLAST local e contrastado com as sequências selecionadas. A sequência dos genes de interesse foi obtida no NCBI.

**TABELA 3. Genes de interesse para busca no transcriptoma de referência.**

Gene	Sequência de referência	Espécie	Referência
<i>1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 9 (ACS9)</i>	NM_114830.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	McCauley et al., 2020
<i>NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 5 (NCED5)</i>	XM_021010359.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	McCauley et al., 2020
<i>ACYL-COA OXIDASE 1 (ACX1)</i>	NM_117778.8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Romero-Puertas et al., 2022
<i>ATP BINDING CASSETTE SUBFAMILY B1 (ABCB1)</i>	NM_129247.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cecchetti et al., 2015
<i>ATP BINDING CASSETTE SUBFAMILY B19 (ABCB19)</i>	NM_113807.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Goggin et al., 2020
<i>LEUCINE-RICH REPEAT PROTEIN KINASE FAMILY PROTEIN (AT1G51820)</i>	NM_001333504.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Goggin et al., 2020
<i>ATP BINDING CASSETTE SUBFAMILY B4 (ABCB4)</i>	NM_130268.4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kubeš et al., 2012
<i>P-GLYCOPROTEIN 12 (ABCB12)</i>	NM_100134.4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Jeness et al., 2022
<i>PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 9 (ABCG37)</i>	NM_115208.4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ito & Gray, 2006
<i>CALLOSE SYNTHASE 1-LIKE (CALS1)</i>	XM_022122972.1	<i>Helianthus annuus</i>	Queiroz et al., 2022
<i>LESION SIMULATING DISEASE 1 (LSD1)</i>	XM_022173612.2	<i>Helianthus annuus</i>	Queiroz et al., 2022
<i>TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1)</i>	JN382008.1	<i>Cynara cardunculus</i> ,	Queiroz et al., 2022
	DQ659621.1	<i>Gossypium hirsutum</i> ,	
	GQ249408.1	<i>Nicotiana tabacum</i> ,	
	KJ018742.1	<i>Prunus salicina</i>	

### 4.3 Resultados e Discussão

#### 4.3.1 Avaliação do padrão de evolução da sintomatologia do herbicida 2,4-D no fenótipo de rápida necrose

O conhecimento do padrão de ocorrência da sintomatologia da rápida necrose causada pelo herbicida 2,4-D é importante para determinação da metodologia de amostragem em estudos relacionados a este mecanismo de resistência e para diagnóstico de sua ocorrência em condições de campo. Inicialmente foi avaliado o tempo de resposta em relação ao acúmulo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) após a aplicação do herbicida 2,4-D na dose de 1608 g ha<sup>-1</sup>. O  $H_2O_2$  é uma espécie reativa de oxigênio (ERO) envolvida na sinalização de estresses e na indução da morte celular (Hossain *et al.*, 2015) e é um dos principais indicativos da ocorrência da rápida necrose causada por 2,4-D. A presença de  $H_2O_2$  foi detectada com DAB pela coloração marrom dos discos foliares coletados em todos os tempos de amostragem avaliados após a aspersão do herbicida 2,4-D na dose de 1608 g ha<sup>-1</sup> no biótipo resistente MARPR9-RN (Figura 2). O estresse oxidativo foi observado logo na primeira amostragem, 1 min após a aplicação do herbicida, com 51,1% da área marcada com DAB. Elevados níveis de  $H_2O_2$  foram observados aos 120 e 200

min após o tratamento, com 65,1 e 76,5% da área marcada com DAB, respectivamente (Tabela 4). No biótipo suscetível não foi observada produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em até 200 min após o tratamento. Para ambos os biótipos não foi identificado estresse oxidativo na ausência do herbicida (Figura 2, Tabela 4). O método de coloração com DAB identificou a presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos tecidos antes da ocorrência dos sintomas visuais de rápida necrose.

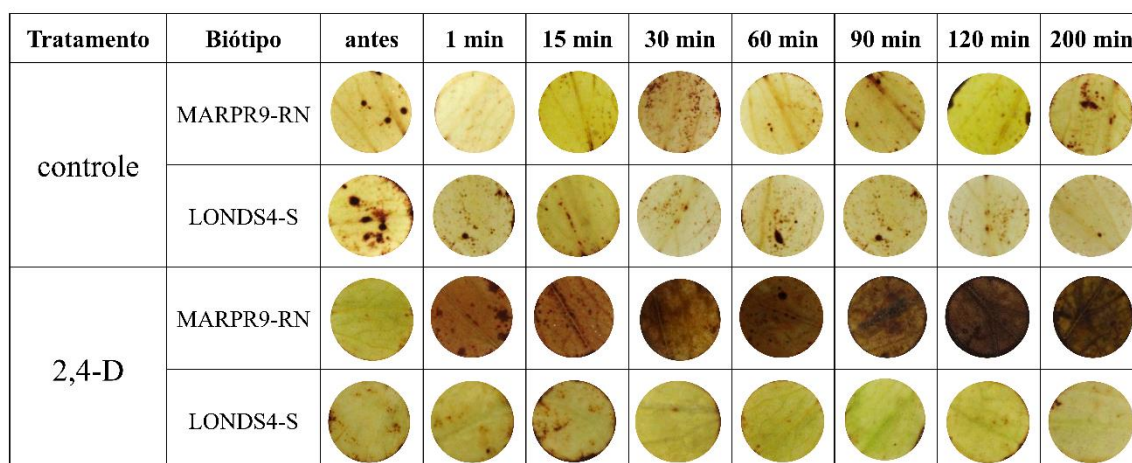


FIGURA 2. Presença de peróxido de hidrogênio em discos foliares de *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN) e suscetível (LONDS4-S) ao herbicida 2,4-D, coletados das plantas antes, 1, 15, 30, 60, 90, 120 e 200 min após a aplicação do herbicida 2,4-D na dose de 1608 g ha<sup>-1</sup> e de plantas controle não tratadas. A coloração marrom dos tecidos indica a presença de estresse oxidativo.

TABELA 4. Presença de peróxido de hidrogênio (%) em discos foliares de *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN) e suscetível (LONDS4-S) ao herbicida 2,4-D, coletados das plantas antes, 1, 15, 30, 60, 90, 120 e 200 min após a aplicação do herbicida 2,4-D na dose de 1608 g ha<sup>-1</sup> e de plantas controle não tratadas.

Biótipo	Tratamento	Peróxido de hidrogênio (%)							
		Tempo de amostragem							
		antes	1 min	15 min	30 min	60 min	90 min	120 min	200 min
MARPR9-RN	controle	34,8 aA	33,7 aB	35,2 aB	34,5 aB	35,2 aB	35,4 aB	34,3 aB	34,6 aB
	2,4-D	33,6 eA	51,1 dA*	52,1 dA*	62,5 bcA*	60,7 cA*	63,9 bcA*	65,1 aA*	76,5 aA*
LONDS4-S	controle	33,7 aA	34,8 aA	34,9 aA	32,0 aA	32,6 aA	33,0 aA	33,7 aA	34,3 aA
	2,4-D	35,6 aA	33,6 aA	35,0 aA	34,5 aA	33,2 aA	33,4 aA	34,0 aA	34,4 aA

Letras minúsculas comparam médias entre tempos de amostragem, letras maiúsculas comparam médias entre tratamento controle e herbicida 2,4-D para cada biótipo, e \* compara médias entre biótipos pelo teste de Tukey (p<0,05).

Estudos anteriores identificaram que a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relacionada à rápida necrose em plantas de *C. sumatrensis* resistentes ao 2,4-D ocorre aos 15 e 30 min após a aplicação do herbicida (Leal *et al.*, 2022; Queiroz *et al.*, 2020) e aos 30 min após o tratamento em plantas de *A. trifida* resistentes ao glifosato (Moretti *et al.*, 2018). A identificação antecipada do acúmulo de ERO nesse estudo pode estar relacionada a aplicação localizada do herbicida que potencializou o início do estresse oxidativo. Em plantas suscetíveis de *C. sumatrensis* foi observada produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> somente 24 h após a aplicação do herbicida 2,4-D (Queiroz *et al.*, 2020). Em plantas de *Pisum sativum* suscetíveis ao 2,4-D foi identificado aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quatro dias após a aplicação de 2,4-D (Romero-Puertas *et al.*, 2004). A produção de espécies reativas de oxigênio é desencadeada pela aplicação do herbicida 2,4-D em plantas, porém a sinalização desse processo é pouco conhecida. Recentemente, a acil-coenzima A oxidase 1 (ACX1) foi descrita como uma das principais fontes de acúmulo de ERO após a aplicação de 2,4-D em *Arabidopsis*. No mesmo estudo foi identificado que ERO peroxissomais derivadas de ACX1 atuam na sinalização das respostas iniciais ao herbicida 2,4-D e regulam a expressão de receptores de auxinas que modulam a ubiquitinação e degradação de AUX/IAA, desencadeando a resposta de epinastia (Romero-Puertas *et al.*, 2022). Alterações que afetem essa sinalização podem acelerar a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no biótipo resistente associado a rápida necrose.

Outro fator importante é a forma de aplicação do herbicida. Avaliações anteriores indicaram que a aplicação através de aspersão resultava em ocorrência irregular da rápida necrose (dados não apresentados) o que inviabiliza a amostragem do tecido vegetal antes da visualização do dano. A aplicação do herbicida através de gotas em local conhecido proporciona o controle da aplicação para amostragem do tecido antes da visualização dos sintomas. No estudo anterior, o herbicida foi aplicado através de aspersão que proporciona a deposição de gotas finas de forma aleatória na superfície foliar. Assim, a uniformidade de distribuição da calda na área foliar pode variar e comprometer a caracterização do sintoma em função da amostragem do tecido foliar. Ainda, como a amostragem através de discos foliares é realizada antes do aparecimento dos sintomas, pode ocorrer que a área escolhida tenha variação da aplicação do herbicida e conseqüentemente da ocorrência da rápida necrose. Experimentos anteriores demonstraram que a aplicação do herbicida 2,4-D na concentração de 8,04 g L<sup>-1</sup> causou rápida necrose de forma consistente no biótipo resistente MARPR9-RN. No entanto, de

forma a maximizar a ocorrência da rápida necrose em toda a área do disco de amostragem de 11 mm existe a necessidade de padronização do número de gotas a ser aplicado.

A presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi uniforme em toda área do disco e em todos os períodos de amostragem somente quando foram aplicadas quatro e oito gotas do herbicida no biótipo MARPR9-RN (Tabela 5, Figura 3). Quando o 2,4-D foi aplicado através de uma ou duas gotas a intensidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi semelhante aos demais tratamentos, contudo a sua distribuição não foi uniforme na área do disco foliar amostrado (Figura 3). A aplicação de apenas uma e duas gotas do herbicida não proporcionou cobertura total do disco foliar de 11 mm coletado. Plantas suscetíveis não apresentaram estresse oxidativo em até 120 min após a aplicação do herbicida (Tabela 5). Quanto aos sintomas visuais, cinco horas após a aplicação do herbicida a área total de necrose foliar foi equivalente nos tratamentos com uma, duas e quatro gotas no biótipo resistente. Após 24 horas, a área total de necrose foliar foi proporcional ao total de gotas aplicadas. A aplicação de quatro gotas correspondeu a necrose de 25,9% da área foliar. Nos tratamentos com menor número de gotas a necrose foi restrita a 8,5 e 12,5% da área foliar para uma e duas gotas aplicadas, respectivamente. A aplicação de oito gotas do herbicida proporcionou uma cobertura de área foliar superior ao abrangido pelo diâmetro do disco coletado (Tabela 5 e Apêndice 1). No tratamento com quatro gotas do herbicida picloram não foi observada a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em discos foliares (Figura 3) e também não ocorreram os sintomas de rápida necrose foliar nos biótipos suscetível e resistente (dados não apresentados).

Em biótipo de *A. trifida* com rápida necrose relacionada a resistência a glifosato também foi avaliado o efeito da aplicação localizada do herbicida na ocorrência dos sintomas (Moretti *et al.*, 2018). Nesse estudo plantas resistentes e suscetíveis com apenas a parte superior ou a parte inferior coberta com papel alumínio foram aspergidas com o herbicida para avaliar os sintomas na porção não tratada da planta. Similar ao observado em *C. sumatrensis*, no biótipo resistente apenas as partes da planta que foram expostas ao glifosato apresentaram rápida necrose. Quando o herbicida foi aplicado apenas nas folhas do baixeiro da planta o meristema apical não desenvolveu necrose. Em contrapartida, as plantas suscetíveis apresentaram injúria total independentemente do local de aplicação (Moretti *et al.*, 2018). Esses resultados indicam a ocorrência de translocação limitada do glifosato nas plantas resistentes e a ocorrência localizada da necrose apenas nos tecidos tratados, reforçando a importância da padronização da aplicação em estudos com plantas com o fenótipo de rápida necrose.

TABELA 5. Presença de peróxido de hidrogênio (%) em discos foliares de *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN) e suscetível (LONDS4-S) ao herbicida 2,4-D, coletados das plantas 1, 15, 30, 60 e 120 min após a aplicação de 0, 1, 2, 4 e 8 gotas do herbicida 2,4-D na concentração de 8,04 g L<sup>-1</sup> e área de rápida necrose foliar (%) 5 e 24 horas após o tratamento (HAT) com o herbicida.

Número de gotas	Biótipo	Peróxido de hidrogênio (%)					Rápida necrose (%)	
		Tempo de amostragem					05 HAT	24 HAT
		1 min	15 min	30 min	60 min	120 min		
controle	MARPR9-RN	33,7 cA	31,5 cA	34,7 dA	32,1 cA	33,8 cA	0,0 c A	0,0 e A
	LONDS4-S	33,8 aA	32,2 aA	33,0 aA	31,6 aA	34,5 abA	0,0 a A	0,0 a A
1 gota	MARPR9-RN	58,7 bA	49,7 bA	45,3 cA	73,1 bA	78,6 bA	8,8 b A	8,5 d A
	LONDS4-S	32,0 aB	34,7 aB	34,5 aB	33,9 aB	31,3 bB	0,0 a B	0,0 a B
2 gotas	MARPR9-RN	65,7 aA	71,2 aA	60,3 bA	76,7 bA	84,8 aA	10,7 b A	12,5 c A
	LONDS4-S	33,0 aB	32,9 aB	32,5 aB	31,4 aB	33,8 abB	0,0 a B	0,0 a B
4 gotas	MARPR9-RN	57,9 bA	66,7 aA	74,4 aA	83,5 aA	85,8 aA	10,2 b A	25,9 b A
	LONDS4-S	33,8 aB	33,4 aB	33,2 aB	35,3 aB	33,9 abB	0,0 a B	0,0 a B
8 gotas	MARPR9-RN	63,0 abA	71,1 aA	71,7 aA	77,8 abA	86,9 aA	21,6 a A	32,2 a A
	LONDS4-S	33,1 aB	32,8 aB	32,8 aB	31,9 aB	36,0 aB	0,0 a B	0,0 a B
CV (%)		6,02	6,55	5,73	6,25	3,45	35,68	15,98

Letras minúsculas comparam médias entre número de gotas e letras maiúsculas comparam médias entre biótipos pelo teste de Tukey (p<0,05). CV: coeficiente de variação.





























































Tratamento	Biótipo	1 min	15 min	30 min	60 min	120 min
controle	MARPR9-RN					
	LONDS4-S					
2,4-D 1 gota	MARPR9-RN					
	LONDS4-S					
2,4-D 2 gotas	MARPR9-RN					
	LONDS4-S					
2,4-D 4 gotas	MARPR9-RN					
	LONDS4-S					
2,4-D 8 gotas	MARPR9-RN					
	LONDS4-S					
picloram 4 gotas	MARPR9-RN					
	LONDS4-S					

FIGURA 3. Presença de peróxido de hidrogênio em discos foliares de *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN) e suscetível (LONDS4-S) ao herbicida 2,4-D, coletados das plantas 1, 15, 30, 60, e 120 min após a aplicação de 0, 1, 2, 4 e 8 gotas do herbicida 2,4-D na concentração de 8,04 g L<sup>-1</sup> e de 4 gotas do herbicida picloram na concentração 2,40 g L<sup>-1</sup>. A coloração marrom dos tecidos indica a presença de estresse oxidativo.

Com base na padronização da aplicação de quatro gotas por área de amostragem o fator concentração das gotas também é importante para obtenção da máxima uniformidade da rápida necrose. No experimento seguinte foram avaliadas concentrações de 0,80 a 8,04 g L<sup>-1</sup> em relação uniformidade do acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como indicativo precoce da ocorrência da rápida necrose no biótipo resistente MARPR9-RN. O estresse oxidativo em discos foliares foi mais elevado e uniforme com a aplicação de maiores

concentrações do herbicida 2,4-D no biótipo resistente (Figuras 4 e 5A). O fator de resistência foi significativo apenas aos 20 e 25 min após o tratamento (Tabela 6). O mesmo foi observado nos sintomas visuais, nos quais a concentração de 8,04 g L<sup>-1</sup> causou necrose em 23% da folha em 5 HAT, enquanto que a redução da concentração pela metade (4,02 g L<sup>-1</sup>) reduziu a necrose a 11% da folha no biótipo MARPR9-RN (Figura 6, Apêndice 2). No biótipo LONDS4-S não foi observado efeito do herbicida no acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou na ocorrência de necrose (Figuras 4, 5B e 6). O fator de resistência foi superior para área de necrose foliar em 2 HAT em relação a avaliação posterior de 5 HAT (Tabela 7). Nenhuma das concentrações avaliadas de picloram causou rápida necrose ou estresse oxidativo em ambos os biótipos (dados não apresentados).























































Concentração (g L <sup>-1</sup> )	Biótipo	1 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min
0	MARPR9-RN						
	LONDS4-S						
0,80	MARPR9-RN						
	LONDS4-S						
2,01	MARPR9-RN						
	LONDS4-S						
4,02	MARPR9-RN						
	LONDS4-S						
8,04	MARPR9-RN						
	LONDS4-S						

FIGURA 4. Presença de peróxido de hidrogênio em discos foliares de *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN) e suscetível (LONDS4-S) ao herbicida 2,4-D, coletados das plantas 1, 5, 10, 15, 20 e 25 min após a aplicação do herbicida nas concentrações de 0; 0,80; 2,01; 4,02 e 8,04 g L<sup>-1</sup>. A coloração marrom dos tecidos indica a presença de estresse oxidativo.



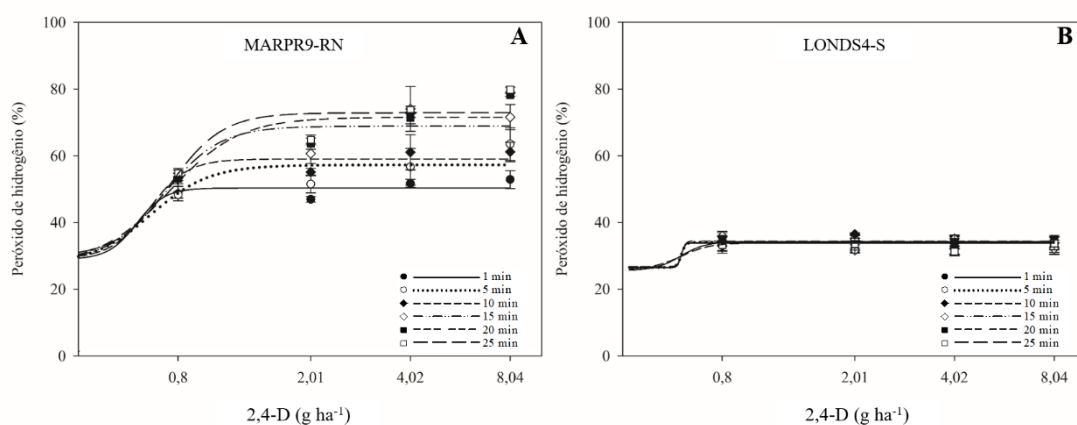


FIGURA 5. Presença de peróxido de hidrogênio (%) em discos foliares de *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN) (A) e suscetível (LONDS4-S) (B) ao herbicida 2,4-D, coletados das plantas 1, 5, 10, 15, 20 e 25 min após a aplicação do herbicida nas concentrações de 0; 0,80; 2,01; 4,02 e 8,04 g L<sup>-1</sup>. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).

TABELA 6. Parâmetros da equação log-logística para presença de peróxido de hidrogênio (%) após 1, 5, 10, 15, 20 e 25 min da aplicação do herbicida em discos foliares de *Conyza sumatrensis* suscetível (LONDS4-S) e resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D.

Biótipos	Parâmetros da equação				IC		FR
	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i> (C50)	Min	Max	
Peróxido de hidrogênio (%) - 1 min							
LONDS4-S	0,031 <sup>ns</sup>	36,652 <sup>ns</sup>	31,806*	17,29	17,29	17,29	
MARPR9-RN	-0,249*	34,156*	71,605*	9,21	-64,07	82,50	0,53 <sup>ns</sup>
Peróxido de hidrogênio (%) - 5 min							
LONDS4-S	15,739 <sup>ns</sup>	32,748*	35,058*	2,44	-3,62	8,50	
MARPR9-RN	-0,562*	31,483*	78,534*	3,04	2,04	4,03	1,25 <sup>ns</sup>
Peróxido de hidrogênio (%) - 10 min							
LONDS4-S	0,002 <sup>ns</sup>	34,471*	32,943*	5,87	-9139,75	9151,49	
MARPR9-RN	-0,447 <sup>ns</sup>	35,125*	73,038 <sup>ns</sup>	1,11	-	-	0,19 <sup>ns</sup>
Peróxido de hidrogênio (%) - 15 min							
LONDS4-S	14,629 <sup>ns</sup>	32,973*	35,068*	1,26	-3,21	5,74	
MARPR9-RN	-1,137*	33,568*	77,189*	0,98	0,54	1,43	0,78 <sup>ns</sup>
Peróxido de hidrogênio (%) - 20 min							
LONDS4-S	0,084 <sup>ns</sup>	35,355*	33,815*	0,52	-2,71	2,76	
MARPR9-RN	0,830*	31,873*	93,598*	1,97	0,54	3,41	3,79*
Peróxido de hidrogênio (%) - 25 min							
LONDS4-S	0,326 <sup>ns</sup>	32,059 <sup>ns</sup>	34,190*	0,79	0,79	0,79	
MARPR9-RN	-1,017*	34,768*	88,481*	1,57	0,98	2,16	1,98*

\*significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; C50: dose necessária para controle de 50%. FR: fator de resistência.

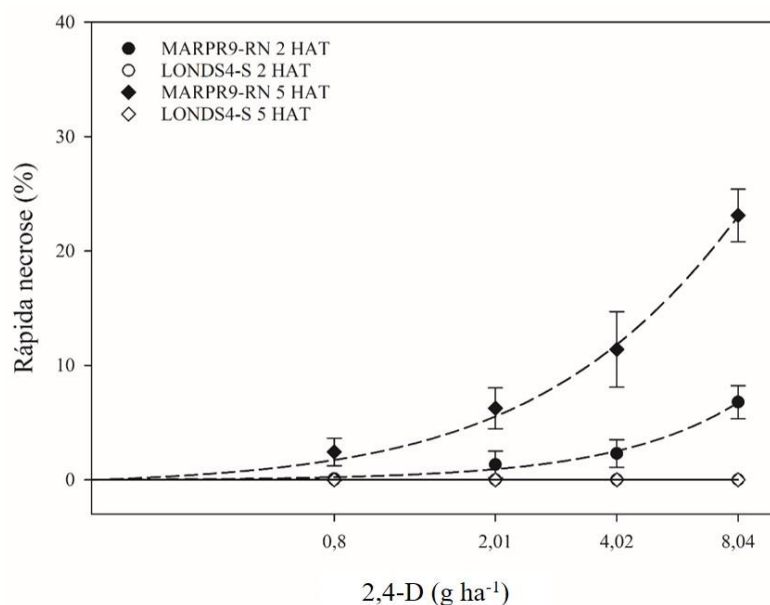


FIGURA 6. Área de rápida necrose foliar (%) em *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN) e suscetível (LONDS4-S) ao herbicida 2,4-D, 2 e 5 horas após o tratamento (HAT) com o herbicida nas concentrações de 0; 0,80; 2,01; 4,02 e 8,04 g L<sup>-1</sup>. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).

TABELA 7. Parâmetros da equação log-logística para área de rápida necrose foliar (%) após 2 e 5 horas da aplicação do herbicida (HAT) em discos foliares de *Conyza sumatrensis* suscetível (LONDS4-S) e resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D.

Biótipos	Parâmetros da equação				IC		FR
	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i> (C50)	Min	Max	
Rápida necrose (%) - 2 HAT							
LONDS4-S	-11,509 <sup>ns</sup>	0,001 <sup>ns</sup>	0,001 <sup>ns</sup>	10537,00	10517,00	10557,00	
MARPR9-RN	-2,590*	0,022 <sup>ns</sup>	10,014*	190,81	170,53	211,08	0,02 *
Rápida necrose (%) - 5 HAT							
LONDS4-S	-64,445*	0,003 <sup>ns</sup>	0,006 <sup>ns</sup>	11671,76	11624,41	11825,74	
MARPR9-RN	-1,043*	0,129 <sup>ns</sup>	26,124*	76,48	71,31	85,38	0,01 *

\*significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; C50: dose necessária para controle de 50%. FR: fator de resistência.

O estudo de curva dose-resposta do herbicida 2,4-D em aspersão indicou o aumento dos sintomas de rápida necrose proporcional ao aumento da dose aplicada (Queiroz *et al.*, 2020). A maior dose avaliada (1608 g ha<sup>-1</sup>) por Queiroz *et al.* (2020) corresponde a maior concentração utilizada nesse estudo (8,04 g L<sup>-1</sup>). A dose comercial recomendada para controle das espécies de *Conyza* corresponde a 1005 g ha<sup>-1</sup> de 2,4-D (DMA<sup>®</sup> 806 BR SL). Assim, a dose de 1608 g ha<sup>-1</sup> representa 1,6 vezes a dose comercial recomendada em uma

situação de aplicação com volume de calda de 200 L ha<sup>-1</sup>. Em outro estudo, no qual foi avaliada a dose recomendada de 1005 g ha<sup>-1</sup> de 2,4-D, foram observados sintomas de rápida necrose entre 30 e 60 min após o tratamento e acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 30 min (Leal *et al.*, 2022). Os resultados obtidos nesses estudos indicam que a resposta de rápida necrose ocorre mesmo para doses baixas do herbicida, porém a intensidade, uniformidade e início da ocorrência dos sintomas e do acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> correspondem a dose aplicada.

A condição de temperatura para o crescimento das plantas e no momento da amostragem também afeta a ocorrência da rápida necrose. O efeito de diferentes temperaturas ambiente na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em plantas resistentes em resposta ao 2,4-D (Figura 7) indicou que plantas mantidas em temperaturas mais baixas (15 e 20°C) (Figura 8A e B) apresentaram estresse oxidativo inferior a plantas mantidas a 25°C (Figura 8C). O mesmo efeito foi observado para os sintomas visuais de rápida necrose em 2, 5 e 24 HAT, principalmente para as concentrações intermediárias (Figura 9A, B e C, Apêndice 3). Para o fator concentração foi obtido o padrão de resposta semelhante ao obtido no experimento anterior, onde a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o desenvolvimento da rápida necrose são proporcionais a concentração do herbicida, principalmente nas avaliações mais tardias. Contudo, a 25°C a área de necrose foliar obtida nas diferentes concentrações do herbicida 2,4-D se equivalem a partir de 5 HAT (Figura 9C).

Anteriormente foi descrito que a temperatura ambiente influencia a resposta de rápida necrose em plantas de *C. sumatrensis* resistentes ao 2,4-D (Queiroz, 2019) e de *A. trifida* resistentes ao glifosato por rápida necrose (Harre *et al.*, 2018). Em *C. sumatrensis* os sintomas de rápida necrose foram observados 2 h após o tratamento em plantas mantidas a temperatura de 25°C, contudo em temperatura de 12°C os sintomas foram observados apenas 1 DAT. Além disso, a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi reduzida em baixa temperatura (12°C) em comparação a temperatura mais elevada (30°C), com início do acúmulo de ERO em 60 e 15 min após o tratamento, respectivamente. Nas plantas suscetíveis os sintomas comuns de epinastia foliar em resposta a um herbicida auxínico também tiveram o início retardado em temperatura baixa e o controle foi inferior a 40% aos 21 DAT (Queiroz, 2019; Queiroz *et al.*, 2020). No geral, temperaturas baixas reduzem a eficiência de controle dos herbicidas auxínicos devido à redução na absorção e na translocação do herbicida na planta (Richardson, 1977). Poucos estudos foram desenvolvidos para avaliar a influência isolada da temperatura na eficiência de controle de herbicidas auxínicos em plantas de *Conyza* (Montgomery *et al.*, 2017; Silva *et al.*,

2021). Contudo, em *Conyza canadensis* que não apresente rápida necrose causada por 2,4-D foi observada maior eficiência de controle quando o 2,4-D foi aplicado ao meio-dia (11 a 13:30 h, 16-26°C) do que quando aplicado no início da manhã (6 a 6:30, 6-13°C) (Montgomery *et al.*, 2017).

Temperatura	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	1 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min
15°C	0						
	2,01						
	4,02						
	8,04						
20°C	0						
	2,01						
	4,02						
	8,04						
25°C	0						
	2,01						
	4,02						
	8,04						

FIGURA 7. Presença de peróxido de hidrogênio em discos foliares de *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D, coletados de plantas mantidas a temperatura ambiente de 15, 20 e 25°C, 1, 5, 10, 15, 20 e 30 min após a aplicação do herbicida nas concentrações de 0; 2,01; 4,02; e 8,04 g L<sup>-1</sup>. A coloração marrom dos tecidos indica a presença de estresse oxidativo.

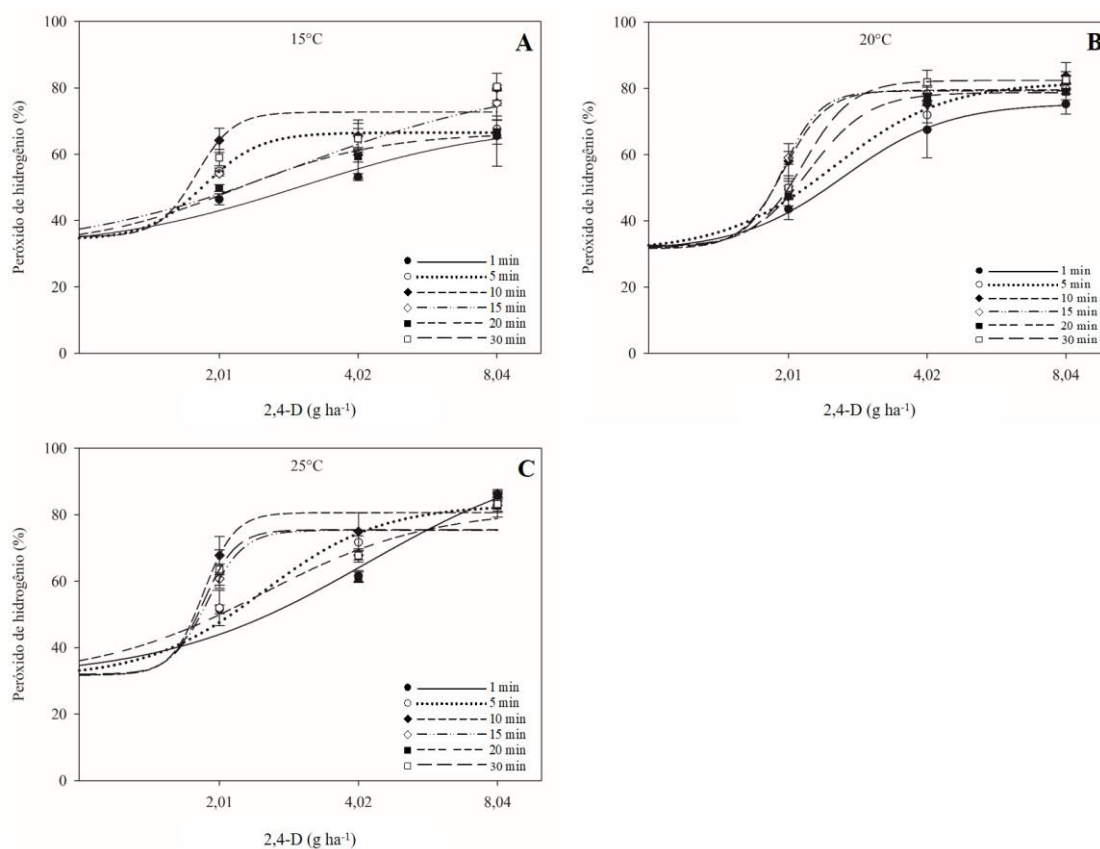


FIGURA 8. Presença de peróxido de hidrogênio (%) em discos foliares de *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D, coletados de plantas mantidas a temperatura ambiente de 15 (A), 20 (B) e 25°C (C), avaliados aos 1, 5, 10, 15, 20 e 30 min após a aplicação do herbicida nas concentrações de 0; 2,01; 4,02; e 8,04 g L<sup>-1</sup>. Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).

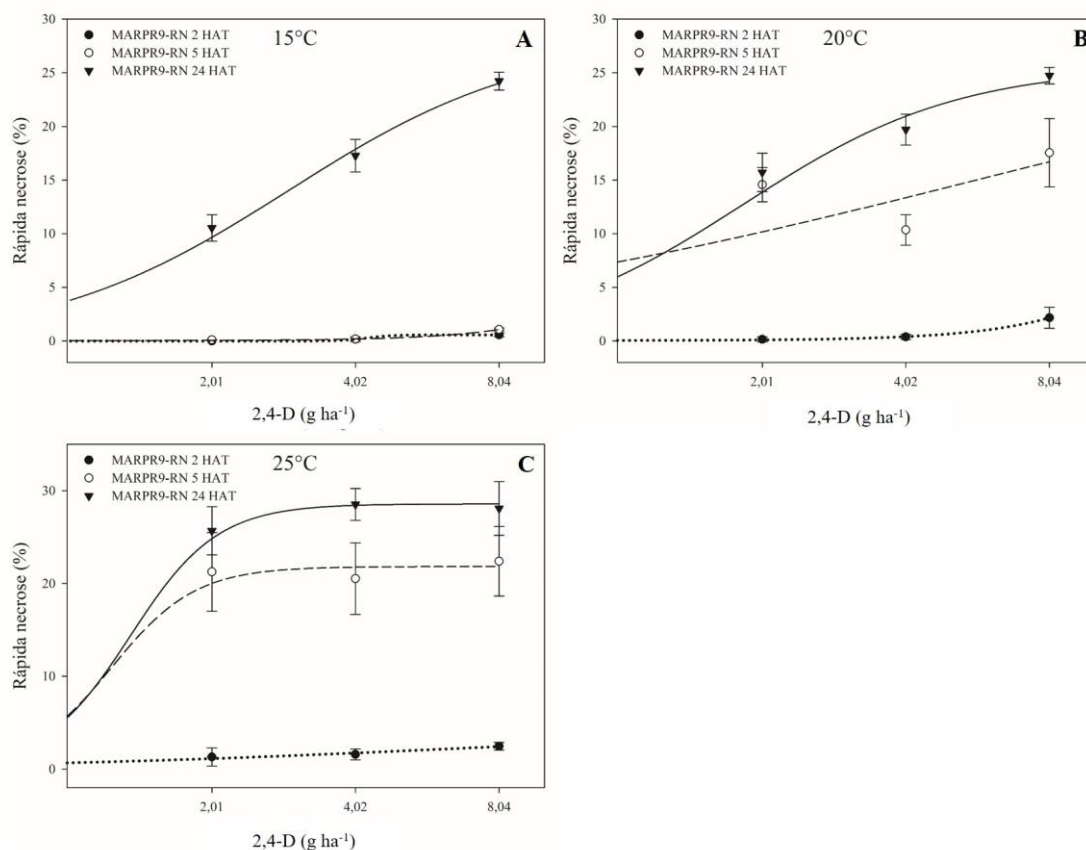


FIGURA 9. Área de rápida necrose foliar (%) em *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D, avaliada em 2, 5 e 24 horas após o tratamento (HAT) com o herbicida nas concentrações de 0; 2,01; 4,02; e 8,04 g L<sup>-1</sup> de plantas mantidas a temperatura ambiente de 15 (A), 20 (B) e 25°C (C). Barras verticais indicam o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).

Conforme os resultados obtidos nesse estudo foram definidos os oito tratamentos e as condições de amostragem para RNA Seq (Tabela 2, Figura 10). Os tratamentos consistiram na aplicação dos herbicidas 2,4-D e picloram nos biótipos MARPR9-RN e LONDS4-S, com coleta do material vegetal aos 5, 30 e 60 min após o tratamento. A aplicação dos herbicidas foi realizada com micropipeta, sendo aplicadas quatro gotas de 0,65 ul cada por folha nas concentrações de 8,04 e 2,40 g L<sup>-1</sup> de 2,4-D e picloram, respectivamente. As plantas amostradas foram conduzidas em câmara de crescimento a 25°C, 13 h de fotoperíodo e luminosidade de 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

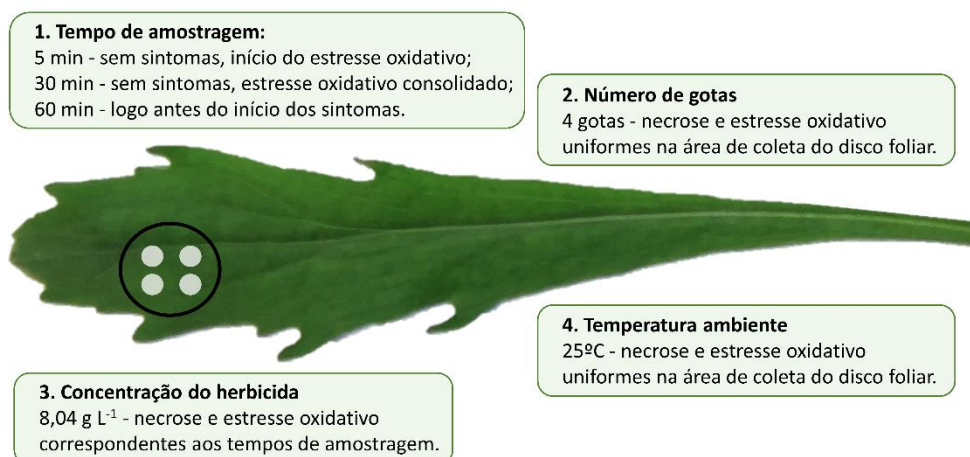


FIGURA 10. Ilustração da amostragem e condições experimentais definidas para coleta do material vegetal de *Conyza sumatrensis* suscetível (LONDS4-S) e resistente por rápida necrose (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D para o estudo de RNA Seq.

A amostragem aos 5 min buscou revelar os genes envolvidos com o início da ativação do mecanismo de resistência no biótipo resistente, enquanto que aos 30 min, os genes expressos com o estresse oxidativo já consolidado. Aos 60 min a amostragem objetivou identificar os genes expressos logo antes do início dos sintomas visuais de rápida necrose. A aplicação dos tratamentos com quatro gotas localizadas na folha buscou padronizar o volume de calda aplicado na área do disco amostardo, ao mesmo tempo que proporcionou boa cobertura da área foliar com o herbicida. A concentração de 8,04 g L<sup>-1</sup> de 2,4-D foi definida por proporcionar o acúmulo uniforme de estresse oxidativo na área do disco foliar, assim como sintomas de necrose bem desenvolvidos. Concentrações mais baixas poderiam mascarar o efeito dos genes relacionados com a resistência, pois os sintomas mostraram-se mais sutis e com atraso no seu início. Por fim, as plantas foram mantidas na temperatura de 25°C, a qual proporcionou o desenvolvimento uniforme dos sintomas e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na área do disco, também de acordo com o obtido em estudos anteriores (Queiroz, 2019, Queiroz *et al.*, 2022). O herbicida picloram foi selecionado para avaliar os genes envolvidos na suscetibilidade do biótipo MARPR9-RN a um herbicida auxínico, dado que esse biótipo não desenvolve resposta de rápida necrose ao picloram.

#### 4.3.2 Sequenciamento do transcriptoma e mapeamento de leituras

A análise inicial da qualidade de RNA indicou que todas as amostras atenderam aos pré-requisitos necessários para o sequenciamento. O número de integridade de todas as amostras foi considerado satisfatório para a construção das bibliotecas (Apêndice 4). O controle de qualidade inicial das leituras brutas provenientes do sequenciamento e a trimagem inicial das bases indicaram a ausência de Ns (bases que não podem ser determinadas), adaptadores e sequências super-representadas, assim como a alta qualidade das bases (Apêndice 4). No início das leituras foi identificado um desvio no conteúdo GC (conteúdo de guanina-citosina), de ocorrência comum em sequenciamentos na plataforma Illumina (Hansen *et al.*, 2010) (Apêndice 5). Logo, foi realizada a trimagem das primeiras 15 bases para que as leituras estivessem adequadas na etapa de normalização digital (Apêndice 6).

Após a redução das leituras redundantes através da normalização digital foi realizada a montagem *de novo* com todas as bibliotecas normalizadas para gerar o transcriptoma de referência. As 24 bibliotecas de cDNA sequenciadas produziram um conjunto de dados montado de alta qualidade. A montagem do transcriptoma produziu 537.136 (> 200 pb) transcritos e 282.371 genes (N50 de 1.214 pb e comprimento médio de 782.71 pb) (Tabela 8). Para confirmar a qualidade da montagem do transcriptoma foi utilizado o programa BUSCO v5 e o banco de dados OrthoDB v10 dentro do grupo Viridiplantae. A partir dessa análise foi identificado que 93,9% dos grupos tem representação completa de genes tanto de cópia-única quanto duplicados, apenas 5,9% são parcialmente cobertos e 0,2% são faltantes. Esse resultado demonstra a alta cobertura de genes ortólogos no grupo Viridiplantae, indicativo de uma excelente montagem do genoma. A partir do transcriptoma de referência montado foram realizados o mapeamento e a contagem das leituras das 24 bibliotecas. O alinhamento geral para todas as 24 bibliotecas foi de 77,9 a 81,9%, sendo que apenas 18,1 a 22,1% das sequências não foram alinhadas (Apêndice 7).



TABELA 8. Resultados da montagem *de novo* com Trinity do transcriptoma de *Conyza sumatrensis*.

Descrição	Resultados da montagem*
Total de bases amostradas	420.422.474
Total de transcritos	537.136
Total de genes	282.371
Conteúdo guanina-citosina (GC) (%)	37.81

\*Resultados da montagem de todas as 24 bibliotecas.

#### 4.3.3 Análise global da expressão de genes

Os genes diferencialmente expressos (DEGs) foram identificados em transcritos que mostraram diferenças de expressão com corte de  $\log_2$  *fold change* ( $\log_2$  FC) maior que 2 (*up* regulados ou regulados positivamente) ou menor que 2 (*down* regulados ou regulados negativamente) e com *false-discovery rate* (FDR) < 0,05 (Apêndice 8). Com base no mapeamento das leituras foram escolhidos pares de tratamentos para realizar a análise de expressão dos genes. A análise dos resultados foi realizada de forma prioritária para os seguintes pares de tratamentos: entre plantas resistentes tratadas com o herbicida 2,4-D em todos os tempos amostrados e plantas controle; plantas resistentes tratadas com o herbicida picloram amostradas aos 30 min após a aplicação e plantas controle; plantas suscetíveis tratadas com 2,4-D amostradas aos 30 e 60 min após a aplicação e plantas controle (Tabela 9).

TABELA 9. Combinação dos tratamentos para análise de expressão diferencial de genes em *Conyza sumatrensis*.

Tratamentos combinados	Biótipo	Tratamento herbicida	Amostragem	Abreviação*
T1-T2	MARPR9-RN	2,4-D / controle	5 min	R - 5 min H / C
T2-T3	MARPR9-RN	controle / 2,4-D	30 min	R - 30 min H / C
T3-T4	MARPR9-RN	2,4-D / 2,4-D	60 min	R - 30 min H / 60 min H
T2-T5	MARPR9-RN	controle / picloram	30 min	R - 30 min P / C
T6-T7	LONDS4-S	controle / 2,4-D	30 min	S - 30 min H / C
T7-T8	LONDS4-S	2,4-D / 2,4-D	60 min	S - 30 min H / 60 min H

\*R - biótipo resistente, S - biótipo suscetível, H - tratamento com 2,4-D, P - tratamento com picloram, C - tratamento controle sem herbicida.

A análise da expressão diferencial de genes em resposta ao herbicida 2,4-D em comparação com a condição controle revelou 595 genes regulados positivamente e 1741 negativamente no biótipo suscetível após 30 min da aplicação (Figura 11). Esse resultado indica que o efeito inicial do herbicida em plantas suscetíveis é mais intenso na repressão do que na indução da expressão gênica. Aos 60 min após o tratamento 124 genes foram expressos e 88 genes tiveram sua expressão reprimida em relação a amostragem aos 30 min (Figura 11). Assim, grande parte dos genes com expressão diferencial no biótipo LONDS4-S foram identificados aos 30 min após o tratamento, indicando que mesmo em plantas suscetíveis, nas quais os sintomas de epinastia iniciam apenas de 3 a 4 horas após a aplicação de 2,4-D (Grossmann, 2010), a sinalização ocorre logo após o tratamento.

Para o biótipo resistente foram identificados 65 genes regulados positivamente e 66 negativamente aos 5 min após a aplicação em comparação com o controle. Aos 30 min após o tratamento com 2,4-D, 724 genes foram expressos e 145 tiveram sua expressão reprimida em relação a plantas não aplicadas. Já, aos 60 min após a aplicação do herbicida, 1727 genes foram regulados positivamente e 335 negativamente em relação a amostragem de 30 min (Figura 11). Ao contrário do observado no biótipo suscetível, em plantas resistentes o herbicida 2,4-D aumentou a expressão de genes ao longo do tempo, mais do que causou a repressão. Nesse mesmo biótipo, 108 genes foram expressos e 102 tiveram sua expressão reprimida 30 min após o tratamento com o herbicida picloram (Figura 11). Esses genes estão envolvidos na suscetibilidade do biótipo MARPR9-RN a um herbicida auxínico, dado que esse biótipo não desenvolve resposta de rápida necrose ao picloram. Em comparação com os genes diferencialmente expressos em resposta ao 2,4-D no mesmo período de amostragem, observa-se que com a aplicação de picloram a expressão foi cerca de 85% menor no biótipo resistente. A quantidade de genes diferencialmente expressos com picloram também foi muito inferior ao identificado com 2,4-D no biótipo suscetível, mesmo que ambos os fenótipos sejam de epinastia. O herbicida picloram é classificado como ácido piridinocarboxílico, enquanto que o 2,4-D pertence à classe dos ácidos fenoxicarboxílicos (Christoffoleti *et al.*, 2015), assim a resposta de epinastia possivelmente envolve diferentes genes para os herbicidas de cada grupo.

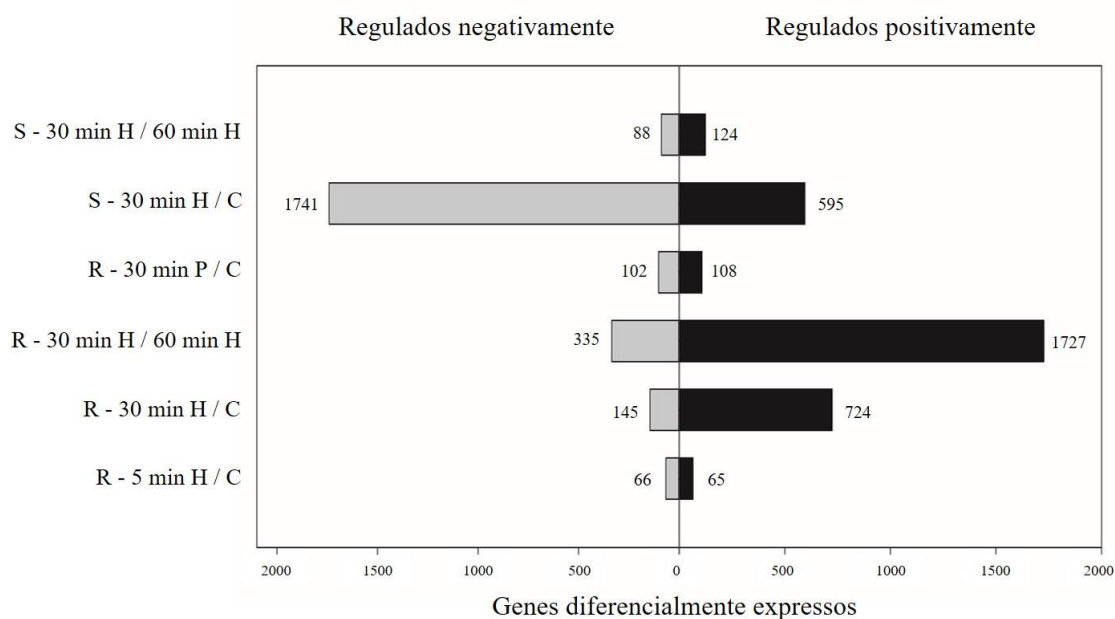


FIGURA 11. Genes diferencialmente expressos em resposta a aplicação dos herbicidas 2,4-D (H) e picloram (P) em relação a condição controle (C) em biótipos de *Conyza sumatrensis* suscetível (S) e resistente (R) ao 2,4-D com fenótipo de rápida necrose.

Estudo realizado com plantas suscetíveis de *C. canadensis* avaliou a expressão diferencial de genes após o tratamento com os herbicidas auxínicos 2,4-D ( $560 \text{ g ha}^{-1}$ ), dicamba ( $280 \text{ g ha}^{-1}$ ) e halauxifen ( $5 \text{ g ha}^{-1}$ ) amostradas 1 e 6 HAT. Após 1 HAT 227 genes foram regulados positivamente em resposta ao 2,4-D e 48 genes foram expressos em resposta aos três herbicidas em comparação ao controle não tratado, sendo eles relacionados as vias de sinalização ativadas por auxinas. Nessa mesma amostragem 261 genes foram regulados negativamente em resposta ao 2,4-D e 322 genes ao dicamba, contudo nenhum gene teve sua expressão reprimida com a aplicação de halauxifen em 1 HAT (McCauley *et al.*, 2020). No presente estudo o tratamento correspondente as plantas suscetíveis amostradas aos 60 min foi comparado com plantas amostradas aos 30 min após a aplicação. Assim, 124 genes foram regulados positivamente aos 60 min além dos 595 genes já expressos aos 30 min, total superior ao obtido no estudo com *C. canadensis*. O mesmo foi observado para os genes negativamente regulados. A variação do número de genes expressos em resposta aos diferentes herbicidas auxínicos em *C. canadensis* não foi discutida, contudo é possível que seja em função das diferentes classes químicas a que esses herbicidas pertencem. Esses resultados sugerem que a regulação de genes em

resposta ao 2,4-D pode variar em função da espécie e de outros fatores relacionados a amostragem.

A análise da sobreposição de genes entre as comparações dos pares foi realizada através dos diagramas de Venn. Três genes foram negativamente regulados tanto no biótipo resistente como no suscetível aos 30 min após a aplicação de 2,4-D (Figura 12A), enquanto que apenas um gene foi positivamente regulado (Figura 12B). Ou seja, nesta avaliação, do total de genes reprimidos, menos de 0,2% são compartilhados pelos biótipos resistente e suscetível, e menos de 0,1% dos genes expressos. Esse resultado indica que a resistência relacionada a rápida necrose no biótipo MARPR9-RN envolve a regulação de genes distintos daqueles relacionados a resposta de suscetibilidade a um herbicida auxínico em *C. sumatrensis*. Resultado semelhante foi encontrado ao se comparar plantas resistentes tratadas com picloram e suscetíveis tratadas com 2,4-D amostradas aos 30 min. Apenas seis genes foram reprimidos e cinco expressos em ambos os grupos (Figura 12C e D). Esse resultado é um indicativo de que a resposta de suscetibilidade ao picloram e ao 2,4-D envolve a regulação de genes diferentes aos 30 min após o tratamento.

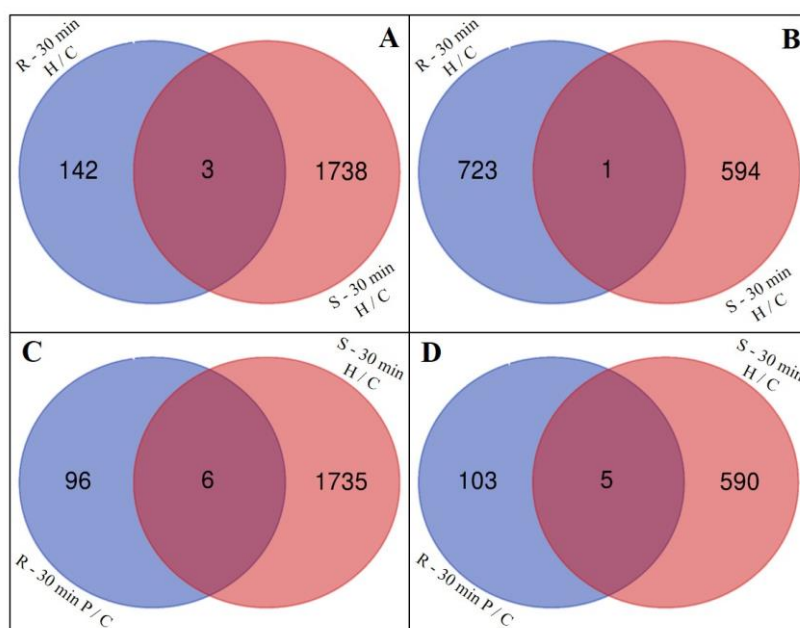


FIGURA 12. Diagramas de Venn da expressão diferencial de genes regulados negativamente (A) e positivamente (B) na análise do transcriptoma de biótipos resistente e suscetível de *Conyza sumatrensis* após 30 min da aplicação de 2,4-D; e genes regulados negativamente (C) e positivamente (D) na análise do biótipo resistente após 30 min da aplicação de picloram e do suscetível após o tratamento com 2,4-D. R - biótipo resistente, S - biótipo suscetível, H - tratamento com 2,4-D, P - tratamento com picloram, C - tratamento controle sem herbicida.

Ao avaliar a evolução da resposta de rápida necrose ao herbicida 2,4-D ao longo do tempo no biótipo resistente foi observado que nenhum gene foi negativamente regulado nos três períodos de tempo amostrados, sete genes foram reprimidos tanto aos 5 min como aos 30 min e apenas dois genes tiveram a expressão limitada aos 5 e 60 min (Figura 13A). O fato de que poucos genes são compartilhados ao longo dos períodos de amostragem é um indicativo de que a resposta de resistência envolve diferentes processos que são desencadeados em sequência ao longo do tempo após o tratamento com o herbicida. Em relação aos genes positivamente regulados, foi identificado que apenas dois deles são expressos em todas as etapas avaliadas após a aplicação do 2,4-D. Apenas um gene foi expresso tanto aos 5 como aos 60 min, 13 genes aos 5 e 30 min e um total de 88 genes aos 30 e 60 min (Figura 13B). Os 65 genes expressos aos 5 min após o tratamento com 2,4-D possivelmente estão envolvidos nas primeiras sinalizações da planta em resposta ao herbicida, sendo que poucos deles também são expressos nas sinalizações mais tardias. Aos 30 min e 60 min após a aplicação são expressos cerca de 11 e 26,5 vezes mais genes do que aos 5 min, respectivamente. Esses genes estão envolvidos com as sinalizações mais tardias do herbicida, sendo que a expressão de muitos deles possivelmente é desencadeada em resposta ao mecanismo de resistência e não está relacionada à sua causa.

Por fim foram sobrepostos os genes diferencialmente expressos entre plantas resistentes tratadas com 2,4-D e picloram e plantas suscetíveis tratadas com 2,4-D, amostradas aos 30 min após a aplicação. Somente 11 e 19 genes foram negativa e positivamente expressos, respectivamente em resposta a ambos herbicidas no biótipo MARPR9-RN. Nenhum gene teve sua expressão reprimida nas três condições e somente um gene foi expresso em todos os grupos comparados (Figura 13C e D). Ou seja, a sinalização que conduz para as respostas de rápida necrose e epinastia em *C. sumatrensis* é significativamente diferente e compartilha poucos genes.

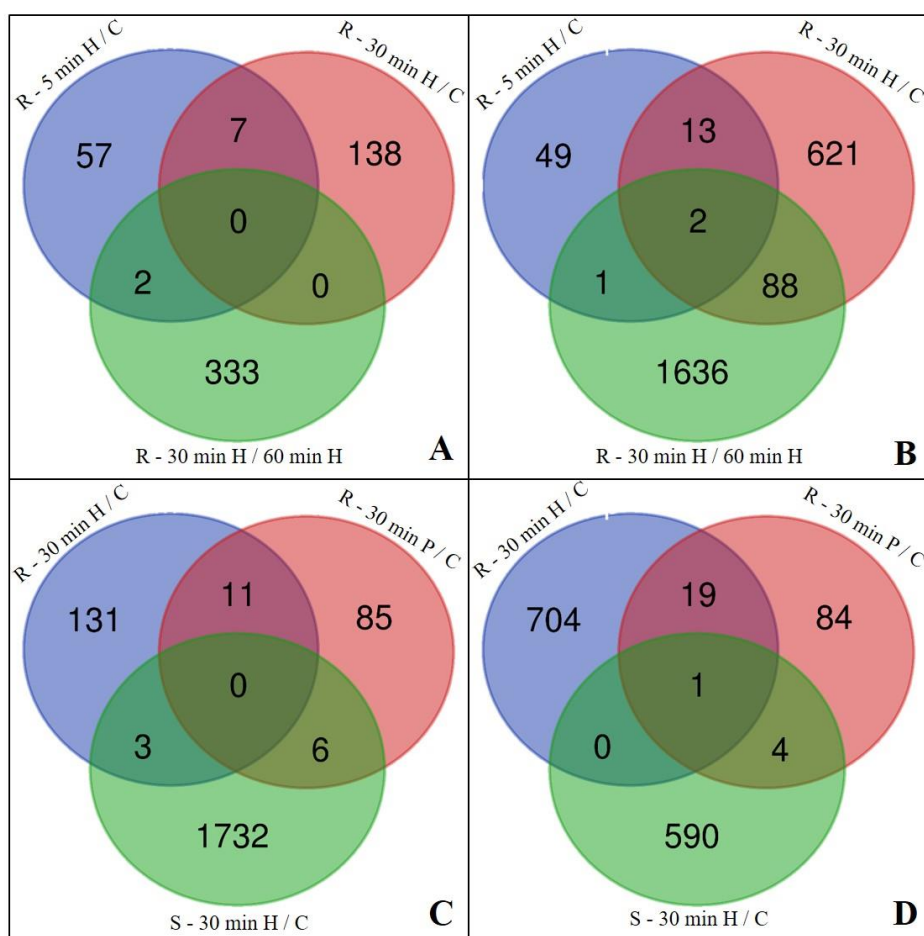


FIGURA 13. Diagramas de Venn da expressão diferencial de genes regulados negativamente (A) e positivamente (B) na análise do transcriptoma do biótipo resistente ao longo do tempo após a aplicação de 2,4-D; e genes regulados negativamente (C) e positivamente (D) na análise do transcriptoma do biótipo resistente após 30 min da aplicação de 2,4-D e picloram e do suscetível após o tratamento com 2,4-D. R - biótipo resistente, S - biótipo suscetível, H - tratamento com 2,4-D, P - tratamento com picloram, C - tratamento controle sem herbicida.

A sobreposição dos genes diferencialmente expressos nas combinações de todos os tratamentos com o herbicida 2,4-D entre plantas resistentes e suscetíveis proporcionou a identificação de 104 genes (56 genes regulados negativamente e 48 genes positivamente) envolvidos apenas nas primeiras sinalizações da resposta de resistência (5 min), 20 genes (sete genes regulados negativamente e 13 genes positivamente) envolvidos nas sinalizações iniciais e intermediárias da resistência (5 e 30 min) e dois genes (zero genes regulados negativamente e dois genes positivamente) associados a todas as etapas de sinalização da resistência avaliadas nesse estudo (5, 30 e 60 min) (Figura 14A e B).

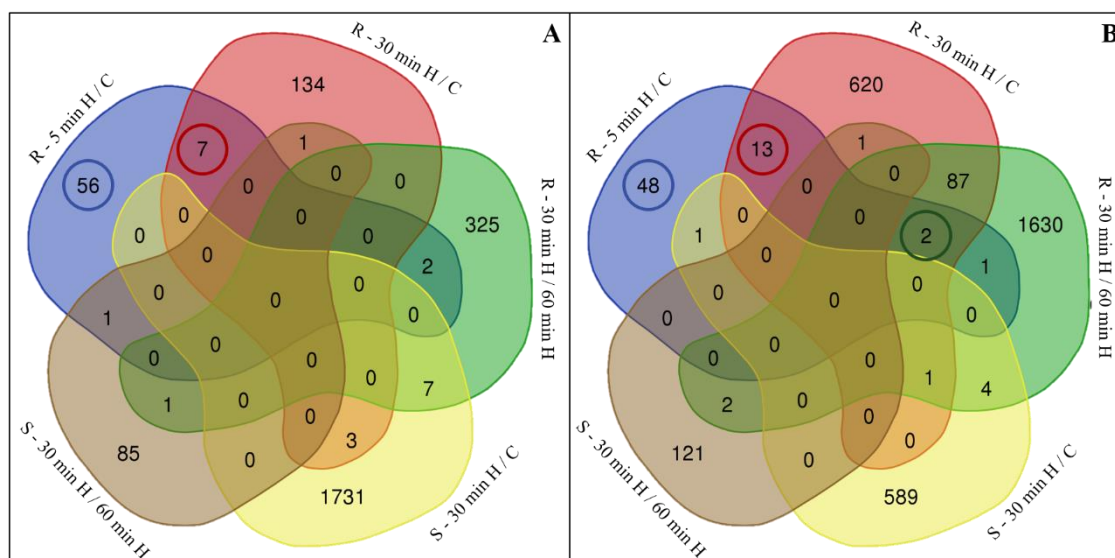


FIGURA 14. Diagramas de Venn da expressão diferencial de genes regulados negativamente (A) e positivamente (B) na análise do transcriptoma dos biótipos resistente e suscetível em todos os períodos de amostragem avaliados após a aplicação de 2,4-D. R - biótipo resistente, S - biótipo suscetível, H - tratamento com 2,4-D, C - tratamento controle sem herbicida.

#### 4.3.4 Ontologia gênica dos genes diferencialmente expressos

A ontologia gênica (GO) dos genes diferencialmente expressos foi realizada em três categorias: processo biológico, função molecular e componente celular. Nessa análise foram identificados os domínios, sítios, famílias e repetições das proteínas com todas as bases de dados que compõem o InterPro. Para esse estudo foi priorizada a descrição da análise dos genes expressos no biótipo resistente dentro dos conjuntos regulados positivamente: apenas aos 5 min após o tratamento; regulados tanto aos 5 como aos 30 min após o tratamento e aos 5, 30 e 60 min, identificados no diagrama de Venn da Figura 14B e descritos na Tabela 10. Nesse primeiro momento os genes presentes nos demais conjuntos foram considerados como não relacionados à resposta inicial de rápida necrose e subtraídos da análise.

TABELA 10. Sequências identificadas dentro dos conjuntos de genes regulados positivamente apenas aos 5 min após o tratamento, regulados aos 5 e aos 30 min após o tratamento e regulados aos 5, 30 e 60 min no biótipo resistente de *Coryza sumatrensis*.

Descrição das sequências identificadas	
<b>48 genes regulados positivamente - 5 min</b>	
110 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component CLO	plastidic glucose transporter 4
25S rRNA (cytosine-C(5))-methyltransferase NSUN5 isoform X2	post-GPI attachment to proteins factor 3-like
acid beta-fructofuranosidase-like	probable inactive receptor kinase At4g23740
Ankyrin repeat-containing protein	probable magnesium transporter NIPA8 isoform X1
auxin response factor 5-like	probable methyltransferase PMT21
calcium-transporting ATPase 8, plasma membrane-type-like	protein FAR1-RELATED SEQUENCE 5-like
cell division cycle protein 48 homolog	protein RAE1
cis-prenyltransferase 3	protein RETICULATA-RELATED 3, chloroplastic-like
CTP synthase	putative GOLD domain-containing protein
cytochrome P450 76C1	putative polyketide hydroxylase isoform X1
DNA-repair protein XRCC1	REF/SRPP-like protein At3g05500
fructokinase-2	Serine protease
GDP-fucose protein O-fucosyltransferase	SKP1-like protein 21
glutamate receptor 3.4	TELO2-interacting protein 1 homolog
glyoxylate/succinic semialdehyde reductase 1	Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing protein
growth-regulating factor 9 isoform X1	toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing protein
importin-11 isoform X1	transcription factor GTE4-like isoform X1
inorganic pyrophosphatase TTM2	ulp1 protease family, C-terminal catalytic domain-containing protein
iron-sulfur cluster biosynthesis family protein	unnamed protein product
mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier-like protein	zinc finger, LIM-type
monoacylglycerol lipase ABHD6-like isoform X2	zinc finger, RING/FYVE/PHD-type, Acyl-CoA N-acyltransferase, Jas TPL-binding domain protein
nucleolar complex protein 2 homolog	---NA---
O-acyltransferase WSD1-like	---NA---
outer arm dynein light chain 1 protein	---NA---
<b>13 genes regulados positivamente - 5 e 30 min</b>	
<b>2 genes regulados positivamente - 5, 30 e 60 min</b>	
5'-deoxynucleotidase HDDC2 isoform X2	patatin-like protein 2
60S ribosomal protein L7-1	uncharacterized protein LOC122606023
alpha/beta hydrolase domain-containing protein 17C	
DNA helicase	
DNA polymerase zeta catalytic subunit isoform X1	
F-box domain, Leucine-rich repeat domain, L domain-like protein	
G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase SD3-1	
plasma membrane ATPase 1	
protease Do-like 7 isoform X1	
receptor-like cytoplasmic kinase 176	
TPR repeat-containing thioredoxin TDX	
trafficking protein particle complex II-specific subunit 120 homolog	
translation initiation factor eIF-2B subunit alpha-like	

#### 4.3.4.1 Efeito do herbicida 2,4-D nas primeiras sinalizações da resistência

Os 104 genes com expressão diferencial identificados apenas na avaliação aos 5 min no biótipo resistente MARPR9-RN estão envolvidos nas primeiras sinalizações logo após o tratamento com o herbicida 2,4-D. Desses, apenas 48 genes foram regulados positivamente (Tabela 10). A ontologia desses 48 genes distribuiu 15,6; 11,5 e 4,6% das



sequências dentro da categoria processo biológico em processo celular, processo metabólico e resposta à estímulos, respectivamente. Os demais grupos dessa categoria representaram menos de 4% do total. Na categoria função molecular 14,2; 11 e 3,7% das sequências foram distribuídas em ligação, atividade catalítica e atividade transportadora. Na categoria componente celular as sequências foram agrupadas em entidade anatômica celular e complexo de proteínas em 15,6 e 4,1% respectivamente (Figura 15).

Nas bases de dados KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) e Plant Reactome (<https://plantreactome.gramene.org/index.php?lang=en>) os genes foram relacionados a 29 e 25 rotas, respectivamente. Dentre elas estão as rotas de sinalização de auxinas (R-FVE-5608118), na qual foi identificada a sequência *auxin response factor 5-like* (ARF5), e a rota de metabolismo de glicerolipídeos (ko00561) relacionada a sequência *O-acyltransferase WSD1-like*, também identificada em diversas rotas de biossíntese de triglicerídeos. Interações entre fatores de resposta à auxina (ARFs) e proteínas repressoras da família AUX/IAA regulam as respostas de auxina. Herbicidas auxínicos ligam-se ao complexo TIR1/AFBSCF estabilizando a sua associação com AUX/IAA, o que conduz a degradação desse repressor e a liberação de ARFs para ativação de genes responsivos à auxina (Grossmann, 2010). No genoma de *Arabidopsis* foram identificados 23 ARFs, entre eles o ARF5 que interage com IAA17 na regulação da resposta às auxinas (Han *et al.*, 2014). Mutações de perda de função em *arf5* foram descritas relacionadas a alterações no fenótipo da planta (Okushima *et al.*, 2005), mas não foram associadas a resistência a herbicidas auxínicos. As demais rotas identificadas não foram relacionadas a resposta da planta ao herbicida

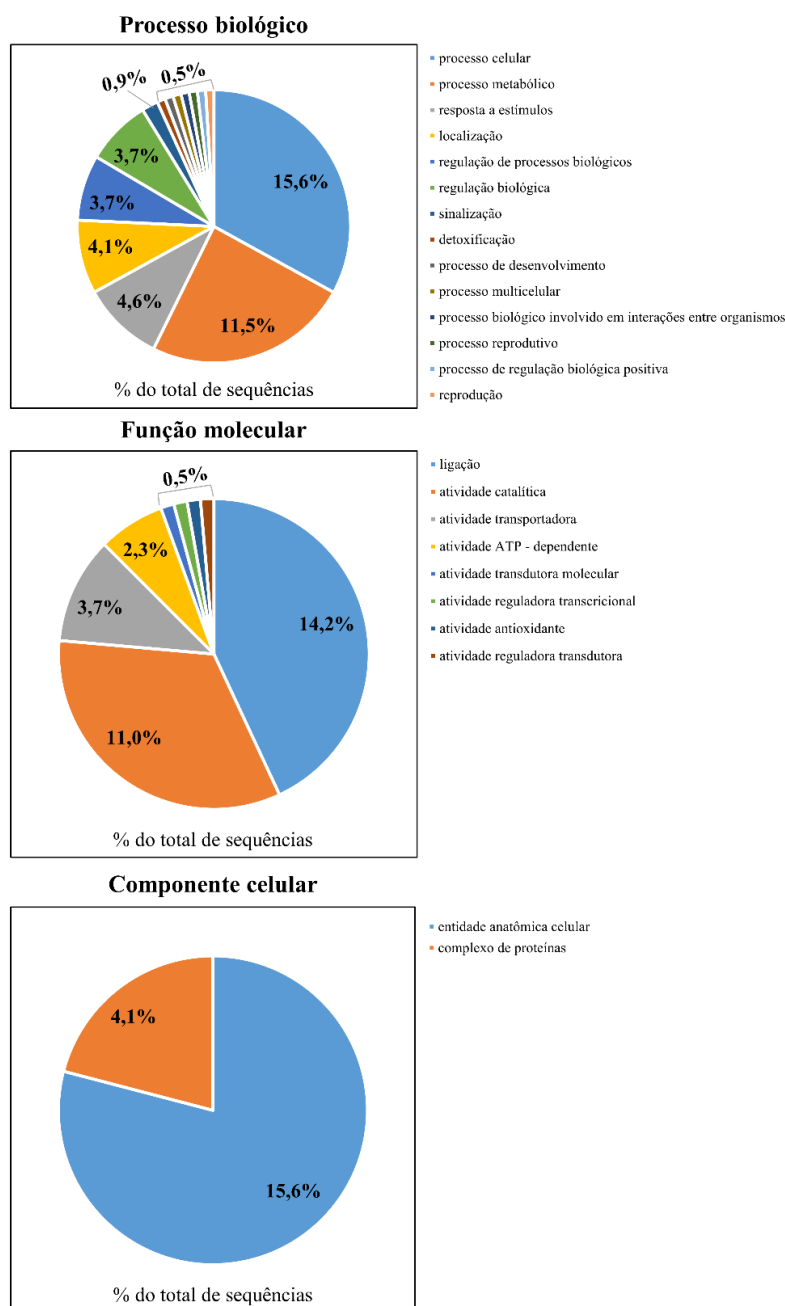


FIGURA 15. Ontologia gênica dos 48 genes regulados positivamente com expressão diferencial identificada apenas na avaliação aos 5 min após o tratamento com 2,4-D no biótipo resistente (MARPR9-RN).

#### 4.3.4.2 Efeito do herbicida 2,4-D nas sinalizações iniciais e intermediárias da resistência

Do total de genes identificados, 20 deles estão relacionados à resposta das plantas resistentes tanto aos 5 min como aos primeiros 30 min após o tratamento com 2,4-D.

Desses, 13 genes foram regulados positivamente (Tabela 10). A ontologia desses genes distribuiu 15; 14 e 3,4% das sequências dentro da categoria processo biológico em processo celular, processo metabólico e localização e resposta à estímulos, respectivamente. Os demais grupos dessa categoria representaram menos de 1,7% do total. Na categoria função molecular 15,3; 13,6 e 3,4% das sequências foram distribuídas em atividade catalítica, ligação e atividade transportadora e ATP-dependente. Na categoria componente celular as sequências foram agrupadas em entidade anatômica celular e complexo de proteínas em 11,9 e 5,1% respectivamente (Figura 16).

Nas bases de dados Reactome (<https://reactome.org/>), Plant Reactome e KEGG os genes foram relacionados a 74, 11 e 10 rotas, respectivamente. Rotas de transporte mediado por proteínas da família ABC de diferentes organismos foram identificadas, contudo relacionadas a sequência *protease Do-like 7 isoform XI*. A proteína PROTEASE DO-LIKE 7 apenas foi descrita como provável serina-protease. Também foram identificadas duas vias de reconhecimento de patógenos fúngicos e bacterianos e resposta imune (R-GRA-9611432, R-AHA-9611432), que abrangem sequências descritas como *receptor-like cytoplasmic kinase 176* e *G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase SD3-I*. Receptores semelhantes a quinases citoplasmáticas (RLCKs) foram identificados na resposta de Arabidopsis e arroz a estresses (Shiu & Bleecker, 2003; Vij *et al.*, 2008). Gene identificado como *G-type lectin S-receptor-like serine/threonine protein kinase* (GsSRK) foi descrito como um regulador positivo da tolerância de plantas ao estresse salino (Sun *et al.*, 2013). As demais rotas identificadas não foram inicialmente relacionadas a resposta da planta ao herbicida.

A expressão de genes envolvidos em rotas de defesa ao ataque de patógenos e resposta imune aos 5 e 30 min após o tratamento com 2,4-D pode indicar que nas plantas resistentes o herbicida 2,4-D está sendo reconhecido como um elicitador patogênico que promove a indução dos genes de defesa, resultando na rápida morte celular dos tecidos. Similar ao processo de hipersensibilidade ao ataque de patógenos, o qual induz a morte celular localizada (Aviv *et al.*, 2002), a percepção do 2,4-D desencadeia sinalização que resulta em rápida necrose e impede que o herbicida seja translocado para os tecidos novos. A expressão desses genes corresponde ao período de ocorrência do estresse oxidativo na planta, antes da percepção visual dos sintomas, conforme descrito anteriormente no estudo da sintomatologia do herbicida no biótipo resistente MARPR9-RN.

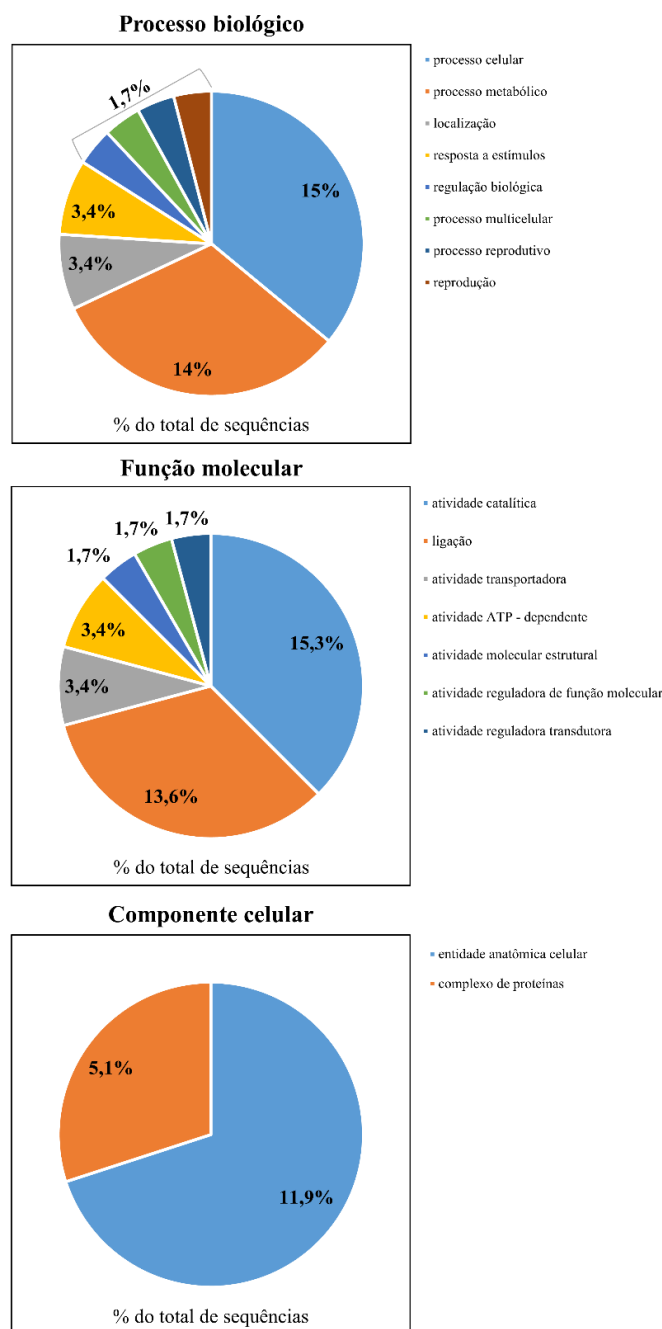


FIGURA 16. Ontologia gênica dos 13 genes regulados positivamente com expressão diferencial identificados na avaliação aos 5 min e aos 30 min após o tratamento com 2,4-D no biótipo resistente (MARPR9-RN).

#### 4.3.4.3 Efeito do herbicida 2,4-D em todas as etapas de sinalização da resistência avaliadas

Dois genes em comum foram regulados positivamente aos 5, 30 e 60 min após o tratamento com 2,4-D em plantas resistentes (Tabela 10) e foram associados as respostas inicial, intermediária e tardia. Um dos genes foi descrito como LOC122606023, uma

proteína não caracterizada. Contudo, o segundo gene foi determinado como *PATATIN-LIKE PROTEIN 2 (PLP2)*, identificado nas rotas de metabolismo de drogas (ko00983) e metabolismo de glicerolípídeos (ko00561) no banco de dados KEGG. Proteínas PATATIN são uma família de acil hidrolases lipídicas que geram ácidos graxos livres e lisofosfolípídios catalisando a hidrólise não específica de lipídios de membrana (Li & Wang, 2014). As funções dessas proteínas e semelhantes foram descritas na tolerância a estresses abióticos e bióticos e nas respostas de crescimento das plantas (Dong *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2021). O gene *PATATIN-LIKE PROTEIN 2* foi recentemente relacionado à interação planta-patógeno, com papel tanto positivo como negativo na resistência da planta a doenças (La Camera *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2021). Em *Arabidopsis* foi identificada a ação negativa desse gene na resistência a *Botrytis cinerea* (La Camera *et al.*, 2005) e *Pseudomonas syringae* (La Camera *et al.*, 2009). Contudo, também foi descrita sua ação positiva na promoção da resistência a *Cucumber mosaic virus* em *Arabidopsis* (La Camera *et al.*, 2009) e a *Verticillium dahliae* em algodão (Zhu *et al.*, 2021). A hipótese é que esse gene atue na provisão de precursores de ácidos graxos para biossíntese de oxilipinas, principalmente jasmonatos e na ativação de sua sinalização para indução ou repressão da expressão de genes de defesa e de detoxificação na planta (La Camera *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2021). Assim, existe a possibilidade de que a expressão desse gene nas plantas resistentes de *C. sumatrensis* logo após a aplicação do herbicida ocorra devido à percepção do 2,4-D como um elicitador patogênico promovendo a biossíntese de oxilipinas e a indução dos genes de defesa da planta.

#### 4.3.5 Busca de genes de interesse no transcriptoma de referência

Para todas as 15 sequências de genes selecionadas com base em estudos de resistência a herbicidas auxínicos foi encontrada correspondência no transcriptoma de *C. sumatrensis* montado nesse estudo. Contudo, apenas seis das sequências foram encontradas dentre os genes diferencialmente expressos contidos nos pares de tratamentos avaliados. Dentre os genes regulados negativamente de plantas resistentes amostradas aos 30 min em comparação com ao controle foi identificada a sequência correspondente ao gene *CALLOSE SYNTHASE 1-LIKE (CALS1)*. Genes dessa família estão relacionados à biossíntese de calose e à resposta de necrose localizada induzida por patógenos (Verma

& Hong, 2001; Wang *et al.*, 2022). Em *Arabidopsis* foi identificado o papel de *CALSI* na modulação do tráfego por plasmodesmas em resposta a estresses abióticos e bióticos, usando ácido salicílico e espécies reativas de oxigênio como sinais de estresse (Cui & Lee, 2016). No estudo com *C. sumatrensis* resistente ao 2,4-D foi observada redução dos níveis de transcritos desse gene após o tratamento com o herbicida nos biótipos resistente e suscetível (Queiroz *et al.*, 2022). Com base nesses resultados é pouco provável que *CALSI* seja um dos principais genes envolvidos no mecanismo de resistência.

Dentre os genes expressos aos 60 min no biótipo resistente foram identificadas três sequências correspondentes ao gene *ATP BINDING CASSETTE SUBFAMILY B4* (*ABCB4*) e outras quatro sequências ao gene *P-GLYCOPROTEIN 12* (*ABCB12*). Ambos os genes pertencem ao subgrupo ABCB da superfamília de transportadores ATP Binding-Cassette (ABC) (Titapiwatanakun & Murphy, 2009; Jenness *et al.*, 2022). A proteína *ABCB4* é um transportador de efluxo de auxina localizado na raiz (Lewis *et al.*, 2007). Também foi descrita sua atividade no influxo de auxinas sob baixas concentrações, mas que foi revertido para efluxo com o aumento da concentração (Yang & Murphy, 2009). Estudos revelaram que essa proteína atua na absorção, mas não no efluxo do herbicida 2,4-D em células sem atividade do transportador *AUX1* (*AUXIN TRANSPORTER PROTEIN 1*). Ainda, *ABCB4* seria um alvo direto da atividade de 2,4-D, pois a ligação de 2,4-D a *ABCB4* resulta no aumento do acúmulo de auxinas nas raízes (Kubes *et al.*, 2012). O gene *ABCB12* é parálogo de *ABCB11*, também descrito com atividade no transporte de auxinas, apesar de ser superada por outros substratos com maior afinidade (Kaneda *et al.*, 2011; Jenness *et al.*, 2022). A expressão desses genes aos 60 min após o tratamento com 2,4-D no biótipo resistente indica a possível ação desses transportadores no aumento da movimentação de 2,4-D do meristema e folhas jovens para tecidos maduros. Assim, a quantidade de herbicida seria reduzida nas partes da planta que não desenvolvem os sintomas de necrose, possibilitando o rebrote da planta a partir desses tecidos, similar ao sugerido em *R. raphanistrum* resistente ao 2,4-D devido a atividade do transportador *ABCB19* (Goggin *et al.*, 2020). No estudo com *C. sumatrensis* não foi identificada a sequência do gene *ABCB19* dentre os DEGs dos grupos avaliados. Contudo, diversos outros membros das famílias ABC foram identificados dentre os genes regulados positivamente aos 60 min no biótipo resistente, nos quais a atividade de transporte de 2,4-D ainda não foi investigada.

Também foram identificadas dentre os genes expressos aos 60 min após o tratamento com 2,4-D no biótipo resistente três sequências correspondentes ao gene *1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 9 (ACS9)* envolvido na via de síntese de etileno (Boller *et al.*, 1979) e uma sequência de *NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 5 (NCED5)* envolvido com a via de síntese de ácido abscísico (ABA) (Kraft *et al.*, 2007; Grossmann, 2010). A expressão de genes ACS induzida por herbicidas auxínicos foi sugerida como alvo primário do modo de ação desses herbicidas, através da morte celular induzida pelo aumento de etileno (Sterling & Hall, 1997). Estudos posteriores observaram aumento simultâneo da expressão de ACS e NCED após o tratamento com herbicidas auxínicos sugerindo que o aumento no nível de etileno induzido pelas auxinas exógenas induz a regulação positiva de NCED (Kraft *et al.*, 2007). Entretanto, em estudo recente não foi observada expressão diferencial de ACS em 1 hora após o tratamento (HAT) de plantas *C. canadensis* suscetíveis com 2,4-D, dicamba e halauxifen. Esse resultado indica um efeito mínimo desses herbicidas na homeostase de etileno nessas plantas (McCauley *et al.*, 2020). Contudo, nesse mesmo estudo a aplicação dos herbicidas auxínicos promoveu o aumento da expressão do gene NCED, o qual conduziu à rápida síntese de ABA, independente dos níveis de etileno. Assim, foi proposto que a morte das plantas em resposta a aplicação de herbicidas auxínicos é induzida pela rápida regulação positiva de NCED que leva à síntese de ABA e à repressão geral do processo de fotossíntese (Gaines, 2020; McCauley *et al.*, 2020). A regulação positiva tanto de ACS como de NCED nas plantas resistentes de *C. sumatrensis* após o tratamento com 2,4-D indica que o mecanismo de resistência relacionado à rápida necrose não atua diretamente na repressão dos genes que induzem a síntese de etileno e ABA, indicados na literatura como alvo do modo de ação de herbicidas auxínicos.

Dentre os genes negativamente regulados no biótipo suscetível aos 30 min foram identificados os genes *ABCB4*, *ABCB12* e *ACS9*. Ao contrário do observado nas plantas resistentes, nas suscetíveis a expressão desses genes é reprimida. Plantas suscetíveis de *Arabidopsis* apresentaram aumento na expressão de *ABCB4* em resposta a 2,4-D e ácido indol-3-acético (IAA) exógeno após 8 h do tratamento. Esse resultado indica que *ABCB4* é um gene de resposta tardia as auxinas (Terasaka *et al.*, 2005). No presente estudo foi avaliada a expressão dos genes somente em até 1 h após o tratamento com 2,4-D, não sendo observada expressão desse gene dentro desse período. A regulação negativa de

*ABCB4* e *ABCB12* nas plantas suscetíveis pode indicar que outros transportadores dessa família estão envolvidos na resposta ao 2,4-D em *C. sumatrensis*.

Por fim, a sequência correspondente ao gene *LEUCINE-RICH REPEAT PROTEIN KINASE FAMILY PROTEIN (AT1G51820)* foi encontrada dentre os genes reprimidos aos 30 min após o tratamento com o herbicida picloram no biótipo resistente. AT1G51820 é uma provável quinase que foi relacionada a resistência a 2,4-D em *R. raphanistrum* através da percepção de 2,4-D na membrana plasmática, contudo sua capacidade de ligação ao 2,4-D ainda não foi confirmada experimentalmente (Goggin *et al.*, 2020). Com base nos resultados do estudo, é pouco provável que a resistência ao 2,4-D em *C. sumatrensis* esteja relacionada a essa proteína.

No Capítulo 1 do presente estudo foi identificado o efeito consistente dos inibidores orthovanadato e verapamil na redução parcial do acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e dos sintomas visuais, assim como no atraso da ocorrência de necrose em plantas resistentes em comparação ao tratamento com o herbicida isolado. Esses compostos atuam na inibição de transportadores ABC (Geisler & Murphy, 2005; Goggin *et al.*, 2016) e possivelmente estão relacionados à limitação do transporte de auxinas. Assim, os resultados obtidos no estudo com inibidores indicam que alterações no transporte de 2,4-D por transportadores ABC podem estar relacionadas com a resistência associada a rápida necrose em buva. De forma complementar a esses resultados, foram identificadas sete sequências correspondentes a genes do subgrupo ABCB da superfamília de transportadores ABC (*ABCB4* e *ABCB12*) selecionados com base na literatura, dentre os genes expressos aos 60 min no biótipo resistente (Cecchetti *et al.*, 2015; Jenness *et al.*, 2022).

A partir desses indicativos foi realizada a busca de sequências correspondentes a transportadores ABC dentre os genes identificados em todos os pares de tratamentos avaliados. A busca do termo “ABC” foi realizada na descrição das sequências e no nome dos grupos da ontologia gênica. Dentre os genes regulados negativamente no biótipo resistente foram identificadas de uma a quatro sequências correspondentes a genes ABC para os quatro pares de tratamentos avaliados (Figura 17). Dentre os genes regulados positivamente no biótipo resistente não foram encontradas sequências correspondentes a busca aos 5 min após o 2,4-D e aos 30 min após o picloram, e apenas uma sequência aos 30 min após o 2,4-D, em relação ao tratamento controle (Figura 17). Entretanto, 44 sequências corresponderam a transportadores ABC dentre os genes expressos aos 60 min em relação aos 30 min após o tratamento com 2,4-D (Figura 17). No biótipo suscetível



foram encontradas 27 sequências compatíveis à busca aos 30 min após o 2,4-D em comparação ao controle não tratado e uma sequência após 60 min em relação a amostragem aos 30 min dentre os genes regulados negativamente. Dos genes regulados positivamente nesse biótipo apenas seis e um corresponderam a transportadores ABC aos 30 e aos 60 min, respectivamente (Figura 17).

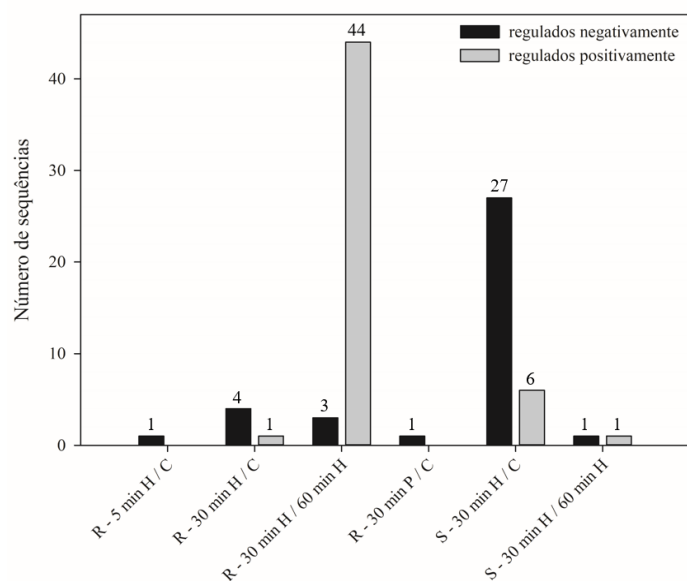


FIGURA 17. Sequências de genes correspondentes a transportadores ABC no transcriptoma de *Conyza sumatrensis*. R - biótipo resistente, S - biótipo suscetível, H - tratamento com 2,4-D, P - tratamento com picloram, C - tratamento controle sem herbicida.

Os resultados dessa busca indicam que no biótipo suscetível genes relacionados a transportadores ABC foram predominantemente regulados negativamente após o tratamento com 2,4-D em relação a condição controle. Dentre eles, foram descritas 9 sequências do gene *PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE PROTEIN 1 (PDR1)* e 8 sequências correspondentes a *putative ABC transporter C family member 15* (Figura 18A). Proteínas de membranas PDR constituem uma subfamília de transportadores ABC envolvida na resistência ao ataque de patógenos e no transporte de auxinas, inclusive o herbicida 2,4-D pela proteína PDR9 (Ito & Gray, 2006). Para o transportador PDR1 ainda não foi descrita atividade na translocação de 2,4-D. Nas plantas resistentes apenas 8 genes relacionados a transportadores ABC foram regulados negativamente em resposta ao 2,4-D, indicando a ocorrência de processos distintos aos que ocorrem em plantas suscetíveis. Contudo, um grande número de genes foi expresso aos 60 min após o tratamento com 2,4-D em relação aos 30 min, resposta não observada após a aplicação de picloram no

biótipo resistente e ao 2,4-D no biótipo suscetível. Essas sequências corresponderam a membros de distintas famílias ABC, com predomínio dos genes *PDR1* e *ABC TRANSPORTER C FAMILY MEMBER 3* (Figura 18B). Em relação ao biótipo suscetível, as plantas resistentes apresentaram maior atividade de transportadores do tipo ABC em resposta ao herbicida 2,4-D, 60 min após a aplicação, inclusive *PDR1* que apresentou regulação negativa nas plantas suscetíveis.

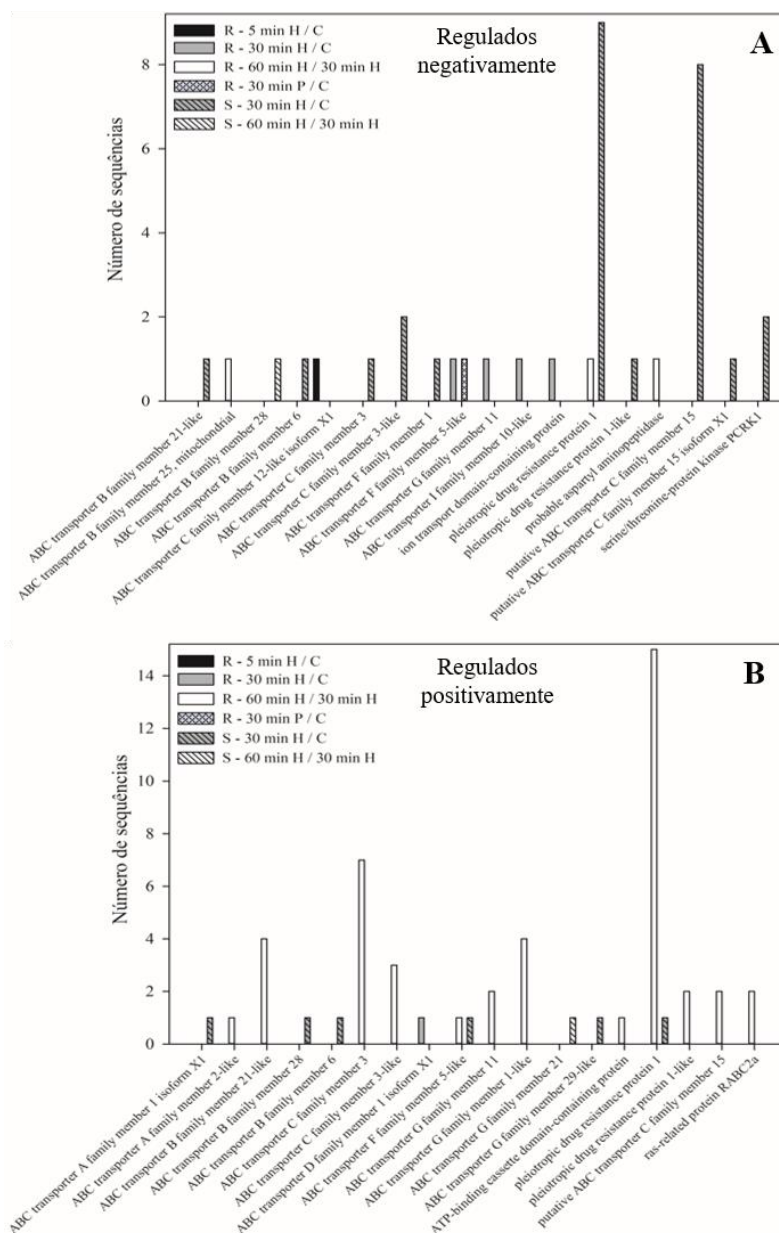


FIGURA 18. Descrição de genes regulados negativamente (A) e positivamente (B) correspondentes a transportadores ABC no transcriptoma de *Conyza sumatrensis*. R - biótipo resistente, S - biótipo suscetível, H - tratamento com 2,4-D, P - tratamento com picloram, C - tratamento controle sem herbicida.

Diferentes proteínas ABCB foram descritas como transportadoras de efluxo de auxinas, envolvidas tanto no transporte polar célula a célula como na facilitação do transporte através do floema a longas distâncias, impedindo o influxo de auxina para as células adjacentes ao floema (Reemmer & Murphy, 2014). As proteínas ABCB1, ABCB4 e ABCB19 foram descritas com atividade no transporte do herbicida 2,4-D (Geisler & Murphy, 2006; Verrier *et al.*, 2008; Kubes *et al.*, 2012). Contudo, proteínas ABC constituem uma superfamília com membros multifuncionais que podem atuar no transporte de diferentes substratos através das membranas (Kang *et al.*, 2011). Assim, outros transportadores ainda não investigados podem ter atividade no transporte de herbicidas auxínicos. E ainda, sequências correspondentes a outros membros de famílias ABC podem não ter sido identificadas dentro dos grupos devido a distinção de nomenclatura da descrita na busca desses genes.

Esses resultados corroboram com o observado no estudo com inibidores de transportadores no Capítulo 1. Assim, é possível que a maior atividade de transportadores ABC de diferentes classes, inclusive as proteínas PDR1, ABCB4 e ABCB12 identificadas na análise do transcriptoma, esteja relacionada ao aumento do transporte de 2,4-D do meristema para outros tecidos, permitindo o rebrote dos tecidos novos. Os inibidores avaliados possivelmente reduziram a atividade de algumas proteínas ABC, permitindo maior efeito do herbicida 2,4-D nas plantas, o que aumentou a injúria. Possivelmente, a resposta da resistência envolve a atividade de diferentes transportadores, o que justifica o efeito apenas parcial dos inibidores no fenótipo de resistência. Caso o mecanismo de resistência estivesse relacionado a translocação reduzida do herbicida pela menor atividade de transportadores, os inibidores não teriam apresentado efeito no aumento da injúria. Em *R. raphanistrum* resistente ao 2,4-D sem fenótipo de rápida necrose foi observada resposta semelhante. Elevadas quantidades do transportador ABCB19 foram associadas ao rebrote de plantas resistentes após o tratamento, possivelmente devido a manutenção do transporte através do floema do 2,4-D, o que reduz a quantidade de herbicida nos tecidos sobreviventes (Goggin *et al.*, 2020). Esse transportador não foi identificado no presente estudo. Entretanto, outras das proteínas transportadoras expressas no biótipo resistente de *C. sumatrensis* podem ter atividade semelhante ainda não descrita.

#### 4.3.6 Expressão diferencial de genes candidatos relacionados ao mecanismo de resistência

Os genes com expressão diferencial identificados na análise dos conjuntos dos diagramas de Venn possivelmente associados a resistência ao 2,4-D estão relacionados principalmente aos processos de resposta de defesa da planta a estresses e ao transporte de auxinas. Os genes selecionados estão descritos na Tabela 11.

TABELA 11. Alteração da expressão (*fold change*) de genes candidatos identificados com regulação positiva apenas aos 5 min após o tratamento, aos 5 e 30 min após o tratamento, aos 5, 30 e 60 min e apenas aos 60 min após o tratamento com 2,4-D em biótipo resistente de *Conyza sumatrensis*.

Gene ID	Anotação	Log2 Fold Change
<b>genes regulados positivamente - 5 min</b>		
<i>ARF5</i>	<i>auxin response factor 5-like</i>	8,56
<i>WSD1</i>	<i>O-acyltransferase WSD1-like</i>	8,50
<b>genes regulados positivamente - 5 e 30 min</b>		
<i>DEGP7</i>	<i>protease Do-like 7 / protease Do-like 7 isoform XI</i>	10,15
<i>SD31</i>	<i>G-type lectin S-receptor-like serine/ threonine-protein kinase SD3-1</i>	9,43
<i>RLCK176</i>	<i>receptor-like cytoplasmic kinase 176</i>	9,10
<b>gene regulado positivamente - 5, 30 e 60 min</b>		
<i>PLP2</i>	<i>patatin-like protein 2</i>	9,46
<b>genes regulados positivamente - 60 min</b>		
<i>NCED5</i>	<i>9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase</i>	8,15
<i>ACS9</i>	<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 9</i>	5,88-11,44
<i>ABCB12</i>	<i>P-glycoprotein 12 / ABC transporter B family member 21-like</i>	3,50-6,10
<i>ABCB4</i>	<i>ATP binding cassette subfamily B4 / ABC transporter B family member 21-like</i>	3,40-6,10
-	<i>ABC transporter G family member 1-like</i>	3,09-11,44
-	<i>putative ABC transporter C family member 15</i>	2,62-8,09
-	<i>ABC transporter C family member 3</i>	2,40-8,48
<i>PDR1</i>	<i>pleiotropic drug resistance 1</i>	2,35-4,22

A partir da identificação desses genes é possível que no biótipo resistente o herbicida 2,4-D seja inicialmente reconhecido como um elicitor patogênico em uma cascata de sinalização e ativação de genes que envolva a proteína PATATIN-LIKE 2, dentre outras. Essa proteína promove a biossíntese de oxilipinas, através da provisão de precursores de ácidos graxos, as quais induzem genes de defesa que promovem a morte

celular dos tecidos, impedindo rapidamente a translocação do herbicida para o meristema. Na sequência, a maior atividade de transportadores PDR1, ABCB4 e ABCB12, dentre outros da família, pode estar relacionada com o aumento do movimento do herbicida do meristema para as folhas maduras e assim promover o rebrote da planta resistente a partir dos tecidos novos. Essa resposta está relacionada ao observado com os inibidores de transportadores ABC orthovanadato e verapamil, que ao inibir parcialmente o transporte do herbicida 2,4-D aumentam a injúria nas plantas resistentes (Figura 19). Contudo, são necessários estudos moleculares complementares com transformação em plantas modelo para validação do papel desses genes candidatos na resistência e entendimento das rotas envolvidas. A avaliação da translocação do 2,4-D nas plantas resistentes também é importante para avaliação da hipótese de aumento do transporte do herbicida.

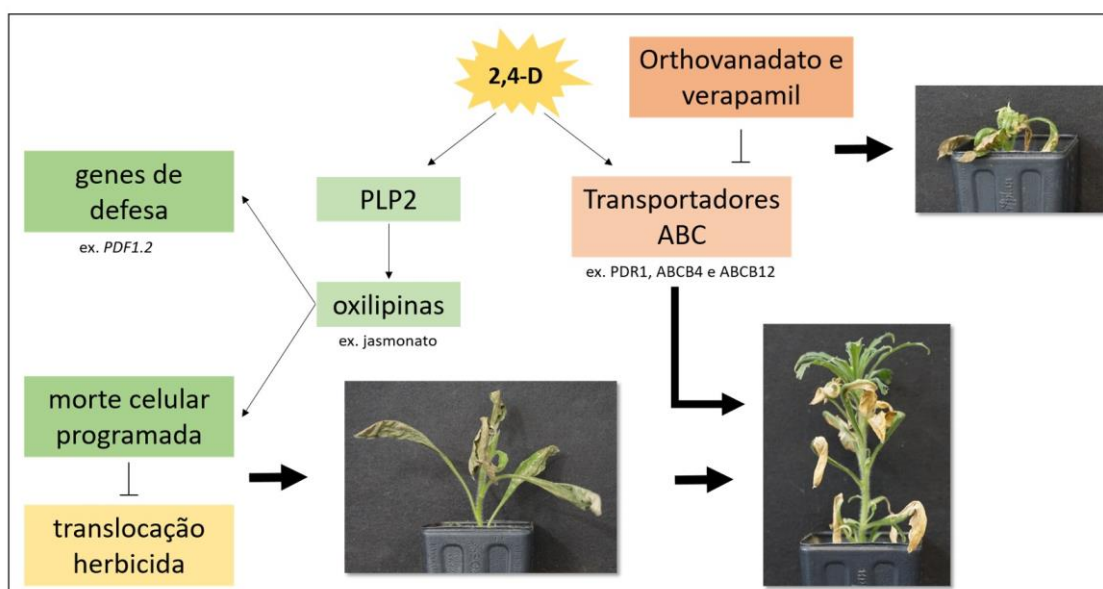


FIGURA 19. Esquema teórico da resposta de rápida necrose e do rebrote de plantas de *Conyza sumatrensis* resistentes ao herbicida 2,4-D. PLP2 - PATATIN-LIKE PROTEIN 2; PDF1.2 - PLANT DEFENSIN 1.2; PDR1 - PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE PROTEIN 1; ABCB4 e ABCB12 - ATP BINDING CASSETTE SUBFAMILY.

#### 4.4 Conclusão

A metodologia desenvolvida mostra consistência e estabilidade da amostragem de discos foliares de 11 mm de diâmetro coletados de plantas resistentes e suscetíveis tratados com quatro gotas do herbicida 2,4-D (8,04 g L<sup>-1</sup>) para o estudo de RNA Seq. A

análise dos transcritos indica que nas plantas suscetíveis o efeito do 2,4-D foi maior na repressão de genes enquanto que nas resistentes foi maior na indução da expressão gênica ao longo do tempo. A sinalização inicial da resposta de rápida necrose envolve o aumento da expressão de genes associados à resposta de defesa da planta a estresses após o tratamento com 2,4-D. Em todos os períodos de amostragem avaliados o gene *PLP2*, relacionado à interação planta-patógeno, foi expresso nas plantas resistentes. Portanto, é possível que em plantas de *Conyza sumatrensis* resistentes a proteína PATATIN-LIKE 2 esteja envolvida com a percepção do 2,4-D como um elicitor patogênico promovendo a biossíntese de oxilipinas e a indução dos genes de defesa que promovem a morte celular dos tecidos, impedindo a translocação do herbicida. Na sequência, a maior atividade de transportadores PDR1, ABCB4 e ABCB12, dentre outros da família, pode estar relacionada ao aumento do transporte de 2,4-D do meristema e tecidos novos para as folhas maduras e assim promover o rebrote da planta resistente a partir desses tecidos.

#### 4.5 Referências

- AVIV, D. H. Runaway cell death, but not basal disease resistance, in *lsd1* is SA- and NIM1/NPR1-dependent. **The Plant Journal**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 381-391, 2002.
- BOLLER, T.; HERNER, R. C.; KENDE, H. Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. **Planta**, Heidelberg, v. 145, p. 293-303, 1979.
- BRABHAM, C. B.; GERBER, C. K.; JOHNSON, W. G. Fate of glyphosate-resistant giant ragweed (*Ambrosia trifida*) in the presence and absence of glyphosate. **Weed Science**, Champaign, v. 59, n. 4, p. 506-511, 2011.
- BROW, C. T. *et al.* A reference-free algorithm for computational normalization of shotgun sequencing data. [S. l.], 2012. Disponível em: <https://arxiv.org/pdf/1203.4802.pdf>. Acesso em: 11 abr. 2022.
- CECCHETTI, V. *et al.* ABCB1 and ABCB19 auxin transporters have synergistic effects on early and late Arabidopsis anther development. **Journal of Integrative Plant Biology**, Hoboken, v. 57, n. 12, p. 1089-1098, 2015.
- CHENG, J.; SONG, N.; WU, J. A patatin-like protein synergistically regulated by jasmonate and ethylene signaling pathways plays a negative role in *Nicotiana attenuata* resistance to *Alternaria alternata*. **Plant Diversity**, Beijing, v. 41, p. 7-12, 2019.
- CHRISTOFFOLETI, P. J. *et al.* Auxinic herbicides, mechanisms of action, and weed resistance: a look into recent plant science advances. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 72, n. 4, p. 356-362, 2015.
- CUI, W.; LEE, J. Y. Arabidopsis callose synthases CalS1/8 regulate plasmodesmal permeability during stress. **Nature Plants**, London, v. 2, n. 5, [art.] 16034, [p. 1-9], 2016.
- DAN, H. A. *et al.* Histórico da infestação de Buva resistente a herbicidas no mundo e no Brasil. In: CONSTANTIN, J. *et al.* (ed.). **Buva**: fundamentos e recomendações para manejo. Curitiba: Omnipax, 2013. cap. 2, p. 5-9.
- DONG, Y. *et al.* Patatin-related phospholipase pPLAIII $\delta$  influences auxin-responsive cell morphology and organ size in Arabidopsis and *Brassica napus*. **BMC Plant Biology**, London, v. 14, [art.] 332, [p. 1-20], 2014.
- DUHOUX, A. *et al.* Transcriptional markers enable identification of rye-grass (*Lolium* sp.) plants with non-target-site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase. **Plant Science**, Shannon, v. 257, p. 22-36, 2017.
- FIGUEIREDO, M. R. A. *et al.* 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**, Washington, DC, v. 119, n. 9, [art.] e2105819119, 2022.

GAINES, T. A. *et al.* RNA-Seq transcriptome analysis to identify genes involved in metabolism-based diclofop resistance in *Lolium rigidum*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 78, p. 865-876, 2014.

GAINES, T. A. The quick and the dead: a new model for the essential role of ABA accumulation in synthetic auxin herbicide mode of action. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 71, n. 12, p. 3383-3385, 2020.

GEISLER, M.; MURPHY, A. S. The ABC of auxin transport: the role of p-glycoproteins in plant development. **FEBS Letters**, West Sussex, v. 580, p. 1094-1102, 2005.

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**, Oxford, v. 67, n. 11, p. 3223-3235, 2016.

GOGGIN, D. E. *et al.* Plasma membrane receptor-like kinases and transporters are associated with 2,4-D resistance in wild radish. **Annals of Botany**, Oxford, v. 125, p. 821-832, 2020.

GRABHERR, M. G. *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, London, v. 29, p. 644-652, 2011.

GROSSMANN, K. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. **Pest Management Science**, Malden, v. 66, n. 2, p. 113-120, 2010.

HAN, M. *et al.* Structural basis for the auxin-induced transcriptional regulation by Aux/IAA17. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 111, p. 18613-18618, 2014.

HANSEN, K. D.; BRENNER, S. E.; DUDOIT, S. Biases in Illumina transcriptome sequencing caused by random hexamer priming. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 38, n. 12, [art.] e131, 2010.

HARRE, N. T.; YOUNG, J. M.; YOUNG, B. G. Environmental factors moderate glyphosate induced antagonism of POST herbicides on the rapid response biotype of glyphosate resistant giant ragweed (*Ambrosia trifida*). **Weed Science**, Champaign, v. 66, p. 301-309, 2018.

HOSSAIN, M. A. *et al.* Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, [art.] 420, [p. 1-19], 2015.

ITO, H.; GRAY, W. M. A Gain-of-Function mutation in the *Arabidopsis* pleiotropic drug resistance transporter PDR9 confers resistance to auxinic herbicides. **Plant Physiology**, Rockville, v. 142, p. 63-74, 2006.



JENNESS, M. K. *et al.* Loss of multiple ABCB auxin transporters recapitulates the Major *twisted dwarf 1* phenotypes in *Arabidopsis thaliana*. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 13, [art.] 840260, [p. 1-15], 2022.

KANEDA, M. *et al.* ABC transporters coordinately expressed during lignification of *Arabidopsis* stems include a set of ABCBs associated with auxin transport. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, p. 2063-2077, 2011.

KANG, J. *et al.* Plant ABC transporters. **Arabidopsis Book**, Rockville, v. 9, [art.] e0153, 2011.

KRAFT, M. *et al.* Indole-3-acetic acid and auxin herbicides up-regulate 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene expression and abscisic acid accumulation in cleavers (*Galium aparine*): interaction with ethylene. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 1497-1503, 2007.

KUBES, M. *et al.* The *Arabidopsis* concentration-dependent influx/efflux transporter ABCB4 regulates cellular auxin levels in the root epidermis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 69, p. 640-654, 2012.

LA CAMERA, S. *et al.* A pathogen-inducible patatin-like lipid acyl hydrolase facilitates fungal and bacterial host colonization in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 44, n. 5, p. 810-825, 2005.

LA CAMERA, S. *et al.* The *Arabidopsis* patatin-like protein 2 (PLP2) plays an essential role in cell death execution and differentially affects biosynthesis of oxylipins and resistance to pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 22, n. 4, p. 469-481, 2009.

LANGMEAD, B.; SALZBERG S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, London, v. 9, n. 4, p. 357-359, 2012.

LEAL, J. F. L. *et al.* Rapid photosynthetic and physiological response of 2,4-D-resistant Sumatran fleabane (*Conyza sumatrensis*) to 2,4-D as a survival strategy. **Weed Science**, Champaign, v. 70, n. 3, p. 298-308, 2022.

LEWIS, D. R. *et al.* Separating the roles of acropetal and basipetal auxin transport on gravitropism with mutations in two *Arabidopsis* Multidrug Resistance-Like ABC transporter genes. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 1838-1850, 2007.

LI, B.; DEWEY, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC Bioinformatics**, Oxford, v. 12, n. 323, p. 1-16, 2011.

LI, M.; WANG, X. pPLA: patatin-related phospholipase as with multiple biological functions. *In*: WANG, X. (ed.). **Phospholipases in plant signaling**. Heidelberg: Springer, 2014. p. 93-108.

MATSUDA, T. Importance of experimental information (metadata) for archived sequence data: case of specific gene bias due to lag time between sample harvest and RNA protection in RNA sequencing. **PeerJ**, Corte Madera, v. 25, n. 9, [art.] e11875, 2021.

MCCAULEY, C. L. *et al.* Transcriptomics in *Erigeron canadensis* reveals rapid photosynthetic and hormonal responses to auxin-herbicide application. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 71, n. 12, p. 3701-3709, 2020.

MONTGOMERY, G. B. *et al.* Effect of time of day of application of 2,4-D, dicamba, glufosinate, paraquat, and saflufenacil on horseweed (*Conyza canadensis*) control. **Weed Technology**, Champaign, v. 31, n. 4, p. 550-556, 2017.

MORETTI, M. L. *et al.* Glyphosate resistance in *Ambrosia trifida*: Part 2. Rapid response physiology and non-target-site resistance. **Pest Management Science**, Malden, n. 74, p. 1079-1088, 2018.

OKUSHIMA, Y. *et al.* Functional genomic analysis of the *AUXIN RESPONSE FACTOR* gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of *ARF7* and *ARF19*. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 2, p. 444-463, 2005.

PINHO, C. F. *et al.* First evidence of multiple resistance of Sumatran Fleabane (*Conyza sumatrensis* (Retz.) E. Walker) to five- mode-of-action herbicides. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v. 13, n. 13, p. 1688-1697, 2019.

QUEIROZ, A. R. S. **Caracterização da resistência ao herbicida 2,4-D em *Conyza sumatrensis* associada à rápida necrose**. 2019. Tese (Doutorado) - Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

QUEIROZ, A. R. S. *et al.* Rapid necrosis: a novel plant resistance mechanism to 2,4-D. **Weed Science**, Champaign, v. 68, n. 1, p. 6-18, 2020.

QUEIROZ, A. R. S. *et al.* Rapid necrosis II: physiological and molecular analysis of 2,4-D resistance in Sumatran fleabane (*Conyza sumatrensis*). **Weed Science**, Champaign, v. 70, n. 1, p. 36-45, 2022.

REEMMER, J.; MURPHY, A. Intercellular transport of auxin. In: ZAŽIMALOVÁ, E.; PETRASEK, J.; BENKOVÁ, E. (ed.). **Auxin and its role in plant development**. Vienna: Springer-Verlag, 2014. p. 75-100.

RICHARDSON, R. G. A review of foliar absorption and translocation of 2,4-D and 2,4,5-T. **Weed Research**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 259-272, 1977.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010.

- ROMERO-PUERTAS, M. C. *et al.* Insights into ROS-dependent signaling underlying transcriptomic plant responses to the herbicide 2,4-D. **Plant Cell and Environment**, London, v. 45, p. 572-590, 2022.
- ROMERO-PUERTAS, M. C. *et al.* Reactive oxygen species mediated enzymatic systems involved in the oxidative action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Plant Cell and Environment**, London, v. 27, p. 1135-1148, 2004.
- SANTOS, G. *et al.* Multiple resistance of *Conyza sumatrensis* to Chlorimuron ethyl and to Glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 32, n. 2, p. 409-416, 2014.
- SEPPEY, M.; MANNI, M.; ZDOBNOV, E. M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness. *In*: KOLLMAR, M. (ed.). **Gene prediction: methods in molecular biology**. New York: Springer, 2019. p. 227-245.
- SHIU, S. H.; BLEECKER, A. B. Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, p. 530-543, 2003.
- SILVA, D. R. O. *et al.* Application time affects synthetic auxins herbicides in tank-mixture with paraquat on hairy fleabane control. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 68. n. 3, p. 194-200, 2021.
- SOARES, D. J. *et al.* Control of glyphosate resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) with dicamba and 2,4-D. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, n. 2, v. 30, n. 2, p. 401-406, 2012.
- STERLING, T.; HALL, J. Mechanism of action of natural auxins and the auxinic herbicides. *In*: ROE, R.; BURTON, J.; KUHR, R. (ed.). **Herbicide activity: toxicology, biochemistry and molecular biology**. Amsterdam: IOS, 1997. p. 111-141.
- SUN, X. L. *et al.* *GsSRK*, a G-type lectin S-receptor-like serine/threonine protein kinase, is a positive regulator of plant tolerance to salt stress. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 170, p. 505-515, 2013.
- TERASAKA, K. *et al.* PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 2922-2939, 2005.
- THORDAL-CHRISTENSEN, H.; ZHANG, Z.; WEI, Y. C. D. Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. **The Plant Journal**, Oxford, v. 11, p. 1187-1194, 1997.
- TITAPIWATANAKUN, B.; MURPHY, A. S. Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition. **Journal of Experimental Botany**. Oxford, v. 60, n. 4, p. 1093-1107, 2009.

TORRA, J. *et al.* Cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance to imazamox and 2,4-D in *Papaver rhoeas*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 160, p. 51-61, 2021.

TULIN, S. *et al.* A quantitative reference transcriptome for *Nematostella vectensis* early-embryonic development: a pipeline for *de novo* assembly in emerging-model systems. **EvoDevo**, London, v. 4, n. 16, p. 1-15, 2013.

VERMA, D. P. S.; HONG, Z. Plant callose synthase complexes. **Plant Molecular Biology**, Waltham, v. 47, p. 693-701, 2001.

VERRIER, P. J. *et al.* Plant ABC proteins: a unified nomenclature and updated inventory. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 13, p. 151-159, 2008.

VII, S. *et al.* The Receptor-Like Cytoplasmic Kinase (*OsRLCK*) gene family in rice: organization, phylogenetic relationship, and expression during development and stress. **Molecular Plant**, Oxford, v. 1, n. 5, p. 732-750, 2008.

WANG, B.; ANDARGIE, M.; FANG, R. The function and biosynthesis of callose in high plants. **Heliyon**, London, v. 8, n. 4, [art.] e09248, 2022.

YANG, H.; MURPHY, A. S. Functional expression and characterization of Arabidopsis ABCB, AUX1 and PIN auxin transporters in *Schizosaccharomyces pombe*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 59, p. 179-191, 2009.

ZHU, Y. *et al.* GhPLP2 positively regulates cotton resistance to verticillium wilt by modulating fatty acid accumulation and jasmonic acid signaling pathway. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v.12, [art.] 749630, [p. 1-18], 2021.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mecanismo de resistência a herbicidas auxínicos em geral envolve ausência do sintoma de epinastia. No entanto, plantas de buva resistentes ao herbicida 2,4-D desenvolvem o fenótipo atípico de rápida necrose dos tecidos logo após o tratamento. Os experimentos realizados no presente estudo com diferentes inibidores metabólicos avaliados através de diferentes metodologias indicam que o mecanismo de resistência ao herbicida 2,4-D relacionado a rápida necrose em *Conyza sumatrensis* possivelmente não envolve a detoxificação clássica do herbicida por enzimas citocromo P450 monooxigenase e glutathione-S-transferase. Entretanto, o efeito de inibidores de transportadores ABC orthovanadato e verapamil na redução parcial dos sintomas ou no atraso da ocorrência de rápida necrose indica que alterações no transporte transmembrana do 2,4-D podem estar relacionadas com a resistência. Ainda, alterações na fotossíntese das plantas resistentes afetam o tempo e a intensidade de resposta ao herbicida 2,4-D, mas não condicionam a ocorrência da resistência.

A metodologia desenvolvida mostra consistência e estabilidade da amostragem de discos foliares tratados com quatro gotas do herbicida 2,4-D para identificação através de RNA Seq do grupo de genes candidatos relacionados a ocorrência de rápida necrose associada a resistência ao 2,4-D. A análise do transcriptoma identifica que em plantas suscetíveis o efeito do 2,4-D é maior na repressão de genes enquanto que nas resistentes é maior na indução da expressão gênica ao longo do tempo após o tratamento herbicida. A sinalização inicial da resposta de rápida necrose envolve o aumento da expressão de genes associados à resposta de defesa da planta a estresses após o tratamento com 2,4-D. Em todos os períodos de amostragem avaliados o gene *PATATIN-LIKE PROTEIN 2* relacionado à interação planta-patógeno, é expresso nas plantas resistentes. Na avaliação mais tardia aos 60 min foi identificada expressão de genes que codificam diferentes

transportadores ABC. Esse resultado corrobora com o observado no estudo com os inibidores metabólicos.

























Os resultados obtidos indicam que em plantas de *C. sumatrensis* resistentes a resposta de rápida necrose envolva diferentes processos que são desencadeados em sequência após o tratamento. Possivelmente, a resposta inicia com a percepção do 2,4-D como um elicitador patogênico, etapa que envolve a proteína PATATIN-LIKE 2, induzindo diferentes genes de defesa que promovem a rápida morte celular dos tecidos, o que impede a translocação do herbicida através do floema para o meristema. Em etapas seguintes, a maior atividade de transportadores do tipo ABCB, dentre eles PDR1, ABCB4 e ABCB12, pode estar relacionada com o aumento do movimento de 2,4-D do meristema e tecidos novos para as folhas maduras e assim promover o rebrote a partir desses tecidos e a sobrevivência da planta resistente.

Os resultados desse trabalho contribuem com a identificação de genes e rotas candidatos a estarem relacionados com a resposta de resistência ao herbicida 2,4-D em buva. Também foram identificados genes diferencialmente expressos em plantas suscetíveis que podem estar envolvidos no modo de ação desse herbicida, e apesar desses resultados não terem sido explorados na presente discussão podem contribuir para pesquisas futuras. Ainda existe a necessidade de realização de estudos moleculares complementares para validação do papel desses genes candidatos na resistência e entendimento das rotas envolvidas. A avaliação da translocação do 2,4-D nas plantas resistentes também é importante para avaliação da hipótese de aumento do transporte do herbicida.

## **6 APÊNDICES**











## Capítulo 2

APÊNDICE 1. Área de necrose foliar em *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN) e suscetível (LONDS4-S) ao herbicida 2,4-D avaliada 5 e 24 horas após o tratamento (HAT) com 0, 1, 2, 4 e 8 gotas do herbicida 2,4-D na concentração de 8,04 g L<sup>-1</sup> e de 4 gotas do herbicida picloram na concentração 2,40 g L<sup>-1</sup>.





































Tratamento	Biótipo	05 HAT	24 HAT
controle	MARPR9-RN		
	LONDS4-S		
2,4-D 1 gota	MARPR9-RN		
	LONDS4-S		
2,4-D 2 gotas	MARPR9-RN		
	LONDS4-S		
2,4-D 4 gotas	MARPR9-RN		
	LONDS4-S		
2,4-D 8 gotas	MARPR9-RN		
	LONDS4-S		
picloram 4 gotas	MARPR9-RN		
	LONDS4-S		



APÊNDICE 2. Área de necrose foliar em *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D avaliada 2 e 5 horas após o tratamento (HAT) com o herbicida nas concentrações de 0; 2,01; 4,02; e 8,04 g L<sup>-1</sup>.

Concentração (g L <sup>-1</sup> )	2 HAT	5 HAT
0		
0,80		
2,01		
4,02		
8,04		

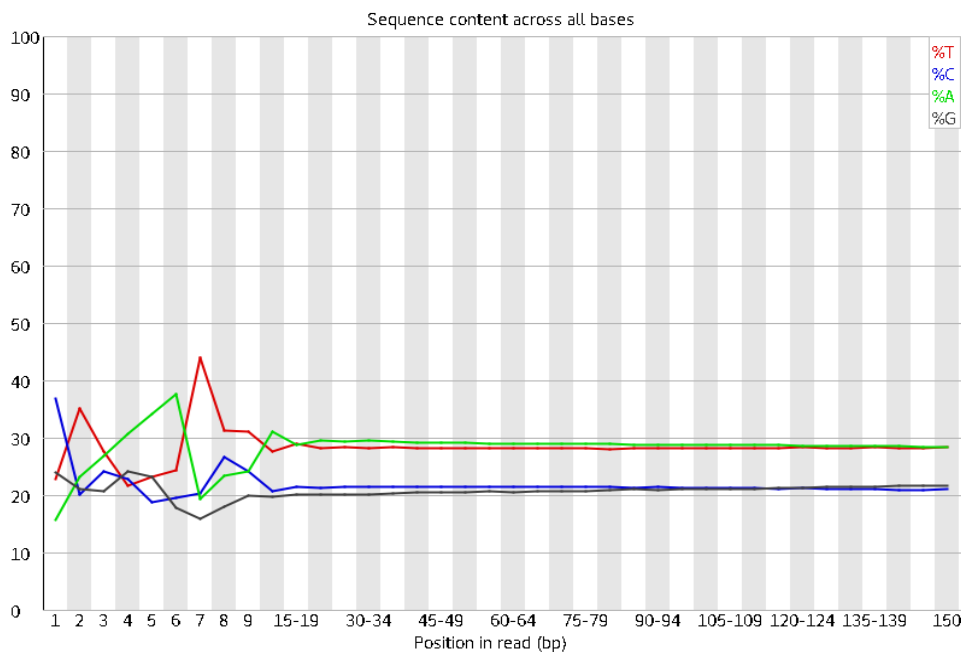
APÊNDICE 3. Área de necrose foliar em *Conyza sumatrensis* resistente (MARPR9-RN) ao herbicida 2,4-D avaliada 2, 5 e 24 horas após o tratamento (HAT) com o herbicida nas concentrações de 0; 2,01; 4,02; e 8,04 g L<sup>-1</sup> de plantas mantidas a temperatura ambiente de 15, 20 e 25°C.

Temperatura	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	2 HAT	5 HAT	24 HAT
15°C	0			
	2,01			
	4,02			
	8,04			
20°C	0			
	2,01			
	4,02			
	8,04			
25°C	0			
	2,01			
	4,02			
	8,04			

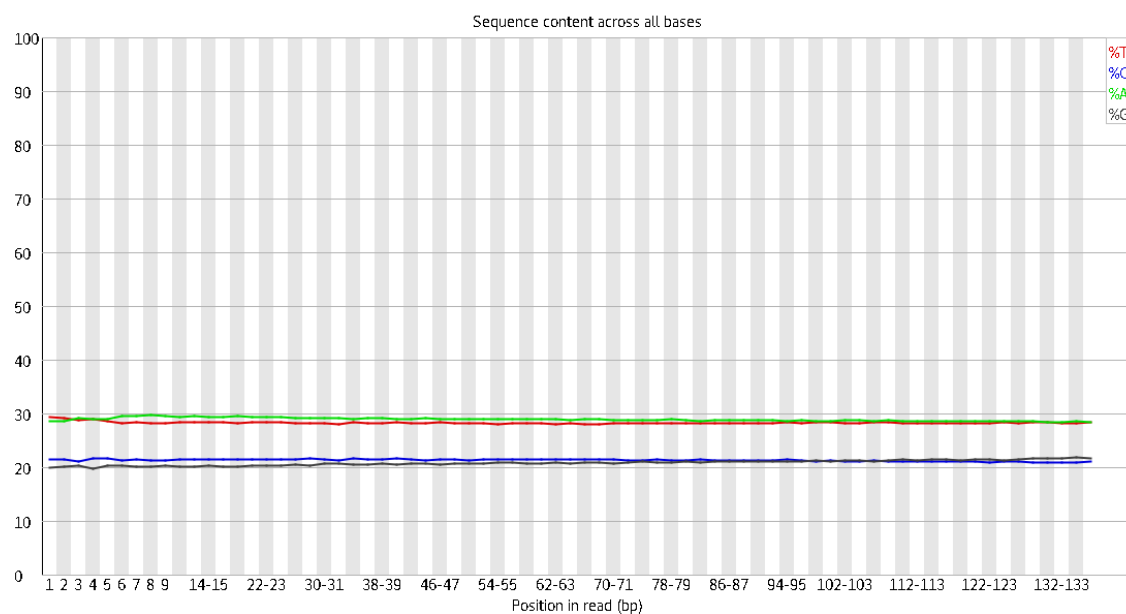
APÊNDICE 4. Número de integridade (RIN) das amostras de RNA obtido na análise de controle de qualidade realizada antes da construção das bibliotecas de cDNA e número de leituras brutas provenientes do sequenciamento das amostras antes da trimagem dos resultados. R1-R3: repetições 1 a 3 de cada tratamento.

<b>Tratamento</b>	<b>Repetição</b>	<b>RIN</b>	<b>Número de leituras brutas</b>
MARPR9-RN 2,4-D 5 min	R1	6,2	49.474.906
	R2	6,2	41.046.656
	R3	6,4	45.240.614
MARPR9-RN controle 30 min	R1	6,4	47.479.782
	R2	6,8	40.234.736
	R3	6,5	86.933.712
MARPR9-RN 2,4-D 30 min	R1	5,9	45.198.684
	R2	6,4	48.129.452
	R3	6,4	41.223.248
MARPR9-RN 2,4-D 60 min	R1	6,5	49.306.116
	R2	6,7	60.648.844
	R3	6,8	46.482.602
MARPR9-RN picloram 30 min	R1	6,3	57.045.472
	R2	6,2	61.653.842
	R3	6,8	61.653.842
LONDS4-S controle 30 min	R1	6,7	47.132.544
	R2	6,2	44.800.646
	R3	6,5	44.279.514
LONDS4-S 2,4-D 30 min	R1	6,5	44.091.820
	R2	5,4	58.945.572
	R3	5,4	54.921.766
LONDS4-S 2,4-D 60 min	R1	4,8	48.380.264
	R2	5,3	40.432.800
	R3	6,8	44.829.082

APÊNDICE 5. Desvio do conteúdo GC (conteúdo de guanina-citosina) no início das leituras da biblioteca correspondente a repetição 1 do tratamento 1 - biótipo resistente (MARPR9-RN), herbicida 2,4-D, coleta 5 min após a aplicação do herbicida.



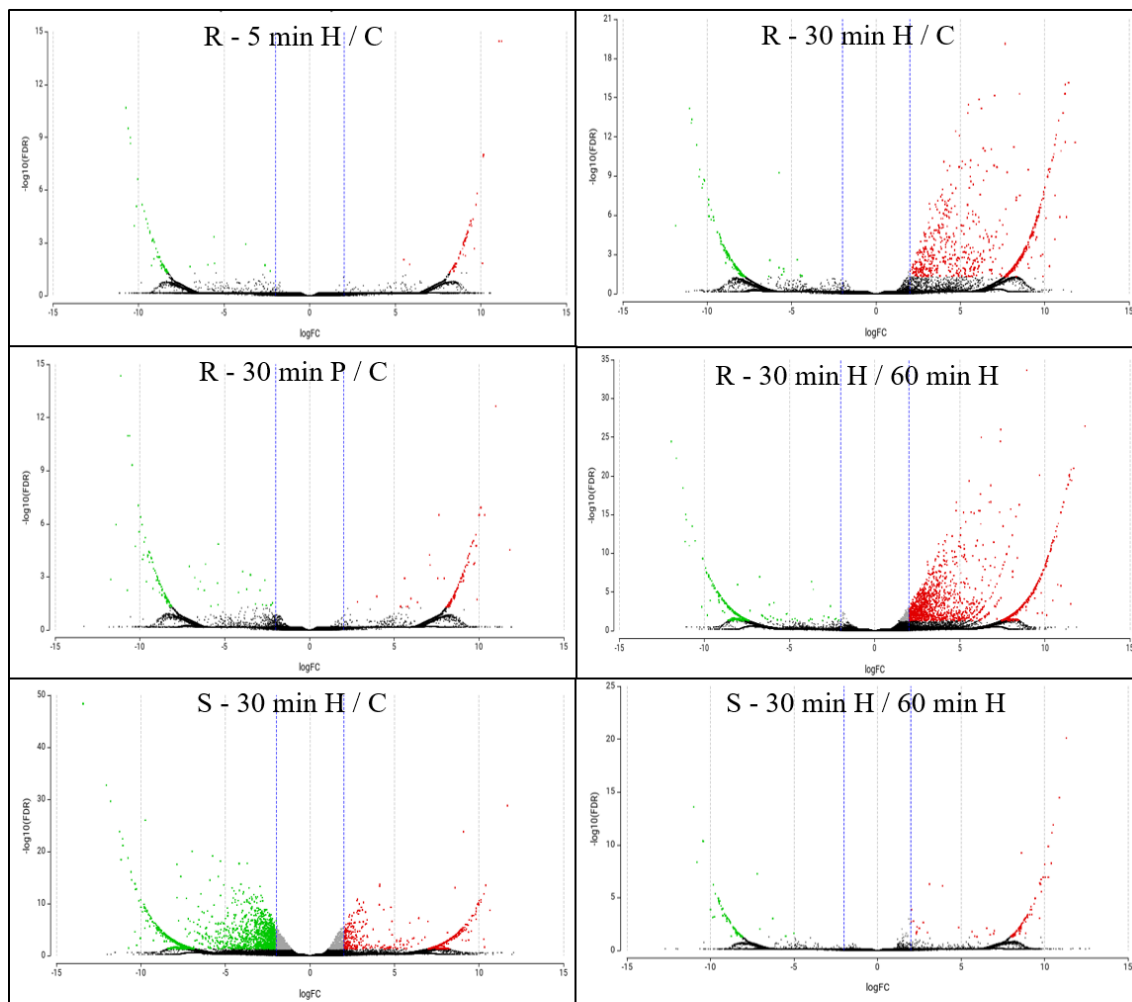
APÊNDICE 6. Correção do desvio de conteúdo GC (conteúdo de guanina-citosina) no início das leituras após trimagem das 15 primeiras bases da biblioteca correspondente a repetição 1 do tratamento 1 - biótipo resistente (MARPR9-RN), herbicida 2,4-D, coleta 5 min após a aplicação do herbicida.



APÊNDICE 7. Mapeamento e contagem das leituras a partir do transcriptoma de referência montado para *Conyza sumatrensis*. R1-R3: repetições 1 a 3 de cada tratamento.

Tratamento	Repetição	Leituras totais	Taxa de alinhamento	Leituras não alinhadas
MARPR9-RN 2,4-D 5 min	R1	24737453	79,13%	5163096 20,87%
	R2	20523328	79,66%	4174275 20,34%
	R3	22620307	79,65%	4602329 20,35%
MARPR9-RN controle 30 min	R1	23739891	79,34%	4905444 20,66%
	R2	20117368	79,99%	4024850 20,01%
	R3	43466856	79,36%	8970801 20,64%
MARPR9-RN 2,4-D 30 min	R1	22599342	79,57%	4617874 20,43%
	R2	24064726	80,45%	4703919 19,55%
	R3	20611624	79,54%	4216940 20,46%
MARPR9-RN 2,4-D 60 min	R1	24653058	79,27%	5111672 20,73%
	R2	30324422	79,47%	6226444 20,53%
	R3	23241301	79,51%	4762501 20,49%
MARPR9-RN picloram 30 min	R1	28522736	79,44%	5865545 20,56%
	R2	30826921	81,92%	5573503 18,08%
	R3	29115688	79,82%	5875960 20,18%
LONDS4-S controle 30 min	R1	23566272	80,22%	4662196 19,78%
	R2	22400323	78,27%	4866997 21,73%
	R3	22139757	78,99%	4652499 21,01%
LONDS4-S 2,4-D 30 min	R1	2204591	79,20%	4586045 20,80%
	R2	29472786	79,38%	6077157 20,62%
	R3	27460883	78,92%	5788104 21,08%
LONDS4-S 2,4-D 60 min	R1	24190132	77,92%	5340100 22,08%
	R2	202164	79,21%	4201981 20,79%
	R3	22414541	78,85%	4740905 21,15%

APÊNDICE 8. *Volcano plots* dos genes diferencialmente expressos para todos os tratamentos combinados. R - biótipo resistente, S - biótipo suscetível, H - tratamento com 2,4-D, P - tratamento com picloram, C - tratamento controle sem herbicida.



● *down* regulado ● *up* regulado ● não significativo