

UFRJ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
VEGETAL E BIOPROCESSOS

DISSERTAÇÃO

**Efeito de herbicidas na fisiologia, morfologia e ultraestrutura celular
de *Setaria viridis* (L.) Beauv**

Diego Caetano Campos de Lelis

2019

**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde**

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos

**EFEITO DE HERBICIDAS NA FISIOLOGIA, MORFOLOGIA E
ULTRAESTRUTURA CELULAR DE *Setaria viridis* (L.) BEAUV**

DIEGO CAETANO CAMPOS DE LELIS

Sob a orientação das Professoras

Fernanda Reinert

Bianca Ortiz da Silva

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Biotecnologia Vegetal**, no curso de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos.

Rio de Janeiro, RJ

Abril de 2019

*A todos que, infelizmente, não tiveram forças para
concluir esse trajeto árduo e muitas vezes injusto*

Dedico e ofereço

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu pai e a minha irmã por todo apoio durante toda a minha vida.

Em segundo, gostaria de agradecer a minha orientadora e amiga professora Bianca Ortiz. Sem a orientação dela nada disso seria possível. Em toda a minha vida acadêmica eu não conheci nenhum orientador que pudesse ser tão bom quanto ela. É um exemplo de profissional inteligente, capaz, justo, trabalhador e honesto, se um dia eu me tornar metade do que ela é como professora e orientadora, eu estarei satisfeito.

Todo o meu agradecimento aos meus colegas de grupo, Catter, David, Ana, Isabela, Gabriel, Camila, Filipe, por me ajudarem durante os dois anos, por me aturarem e pelo ótimo convívio, conversas e histórias tornaram a ida ao fundão mais divertida.

Agradeço a professora Fernanda Reinert por ter me aceito ao seu grupo de pesquisa e por ter me dado a honra conhecer uma pessoa tão brilhante, divertida e muito generosa, sem ela eu não teria conhecido esse grupo de pesquisa maravilhoso. Ao professor Ricardo Vieira por ceder o seu laboratório para que todos nós conseguíssemos desenvolver nossa pesquisa. A professora Cris, por ser sempre solícita e atenciosa para esclarecer as minhas dúvidas e pela sua contribuição no presente trabalho.

Deixo meu agradecimento aos meus amigos Victor, Monique e Elias, com quem tive e tenho o prazer de morar junto e dividir minhas felicidades e angústias.

Por último, mas de suma importância, agradeço a CAPES por ter me dado o privilégio de financiar o meu projeto de pesquisa.

RESUMO

Setaria viridis é uma gramínea da família Poaceae com ampla distribuição mundial, pertencente ao clado Panicoideae que abrange as principais gramíneas utilizadas na alimentação, na produção de biocombustível e na bioenergia, como milho (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). *Setaria viridis* tem sido utilizada em estudos científicos como modelo genético de gramíneas com metabolismo fotossintético de C₄ devido ao seu pequeno genoma (~ 515 Mb), um ciclo de vida curto (~ 60 dias) e pequena estatura (10-40cm). *Setaria viridis* é considerada uma planta daninha em alguns países como Canadá, França e Estados Unidos, apresentando grande espectro de resistência a herbicidas, o que determina diminuição da produtividade de algumas culturas. Herbicidas são agroquímicos comumente usados na agricultura e, embora a maioria dos estudos busca avaliar a influência dos herbicidas na fisiologia e metabolismo das plantas, poucas descrições das alterações anatômicas e ultraestruturais são avaliadas. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos dos herbicidas Paraquat, Diuron e sua ação conjunta (Paraquat+Diuron) na fluorescência transiente, anatomia e ultraestrutura de folhas de *Setaria viridis* após o período de 24h e 96h de sua aplicação. Secções foliares do terço médio da folha do quinto nó foram fixadas com solução de Karnovsky, desidratadas em série etanólica crescente, pós-fixadas com tetróxido de ósmio e embebidas em resina Spurr. Paraquat e Paraquat+Diuron ocasionaram a redução drástica na fotossíntese a partir de 2 horas após a aplicação ($F_v/F_M < 0,2$). A análise anatômica dos cortes foliares evidenciou o padrão de alterações que incluem retração das células epidérmicas, que se mostraram enrugadas e murchas, e do mesofilo em todos os tratamentos em 24 horas após a aplicação. Somente Paraquat alterou significativamente as dimensões estomáticas. Análises ultraestruturais dos tratamentos com Paraquat e Paraquat+Diuron mostraram a degradação das membranas tilacoides e grana dos cloroplastos da bainha vascular e do mesofilo. Em contraste, os cloroplastos no tratamento com Diuron, mantiveram a ultraestrutura das membranas tilacoides estromais e grana preservadas. Em 96 horas após a aplicação de Diuron observou-se redução da espessura foliar ocasionada pelo decréscimo das dimensões celulares. Nas análises da superfície foliar foi observado aparente degradação na epiderme. Adicionalmente, a presença dos corpos de sílica tornou-se mais evidente. Em 96 horas após a aplicação os cloroplastos da bainha vascular e do mesofilo mostraram degradação da membrana tilacoide e grana. Nossos resultados evidenciam o potencial de *Setaria viridis* como modelo de estudo e contribui para elucidar os efeitos progressivos de Paraquat e Diuron na fotossíntese, anatomia, morfologia e ultraestrutura celular vegetal de gramíneas C₄.

Palavras-chave: *Setaria viridis*, anatomia, ultraestrutura, herbicida, Diuron, Paraquat.

ABSTRACT

Setaria viridis is a grass of the Poaceae family with a wide distribution worldwide, belonging to the clade Panicoideae which includes the main crop grasses used to feed, biofuel and bioenergy production, as maize (*Zea mays*), sorghum (*Sorghum bicolor*) and sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Setaria viridis* has been used in scientific studies as a genetic model for grasses with the C₄ photosynthetic metabolism due to its small genome (~ 515 Mb), a short life cycle (~ 60 days) and small stature (10-40cm). It is unknown whether this genetic diversity correlates with variability in important adaptive traits such as herbicide resistance. *Setaria viridis* is a weed in some countries such as Canada, France and the United States, presenting a wide spectrum of resistance to herbicides, which determines a decrease in the productivity of some crops. Herbicides are commonly used in agriculture, and most studies seek to evaluate the influence of herbicides on plant physiology and metabolism. The objective of this study was to analyze the effects of the herbicides Paraquat, Diuron and its combination (Paraquat+Diuron) on transient fluorescence, leaf anatomy, foliar surface and ultrastructure after 24h and 96h herbicide application. Leaf sections of the middle third of the leaf of the fifth node were fixed with Karnovsky's solution, dehydrated in increasing ethanolic series, post fixed with osmium tetroxide and soaked in Spurr resin. Paraquat and Paraquat+Diuron caused a drastic reduction in photosynthesis from 2 hours after application ($F_v/F_m < 0.2$). The anatomical analysis of the leaf cross sections evidenced a retraction of the epidermal and mesophyll cells in all 24 hours after application treatments. On the leaf surface, the epidermal cells crinkled and withered. Only Paraquat significantly altered the area and width of the stomata. Paraquat and Paraquat+Diuron caused degradation of the thylakoid and grana membranes of the bundle sheath and mesophyll chloroplasts. In contrast, the chloroplasts of the Diuron treatment maintained the ultrastructure of the preserved stromal thylakoid membranes and grana. In 96 hours after application, Diuron affected the size of all cells of the leaf tissue causing the reduction of leaf thickness. In the analysis of the leaf surface an apparent degradation in the epidermis and some fractures were observed. In addition, the presence of the silica bodies became more evident. In 96 hours after application the chloroplasts of bundle sheath and mesophyll cells had degradation of the thylakoid membrane and grana. Our results evidenced the potential of *Setaria viridis* as a model plant and contribute to elucidate the effects of Paraquat and Diuron on photosynthesis, anatomy, morphology and plant cell ultrastructure of C₄ grasses.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 Agricultura.....	1
1.2 Plantas daninhas	3
1.3 Herbicidas	6
1.3.1 Classificação e mecanismo de ação dos herbicidas.....	7
1.3.2 Resistência.....	11
1.3.4 Absorção e Translocação.....	12
1.3.5 Diuron.....	14
1.3.6 Paraquat	15
1.4 Fotossíntese	18
1.5 <i>Setaria viridis</i> (L.) Beauv	21
1.5.1 <i>Setaria viridis</i> (L.) Beauv: organismo modelo	28
2. Objetivos.....	30
2.1 Objetivos específicos.....	30
3. Material e Métodos.....	31
3.1 Germinação.....	31
3.2 Desenho experimental e tratamentos.....	32
3.3 Aplicação dos herbicidas	32
3.4 Sintomas foliares visíveis	32
3.5 Fluorescência transiente	33
3.6 Microscopia	35
3.7 Análises morfométricas	36
3.8 Análises estatísticas	36
4. Resultados.....	37
4.1 Sintomas visíveis	37
4.1.1 Paraquat	39
4.1.2 Diuron.....	41
4.1.3 Paraquat+Diuron.....	43
4.2 Fluorescência transiente da clorofila <i>a</i>	45
4.2.1 Paraquat	45
4.2.3 Diuron.....	46
4.2.4 Paraquat+Diuron.....	50
4.3 Superfície.....	51

4.3.1 Controle	51
4.3.2 Paraquat	52
4.3.3 Diuron	52
4.3.4 Paraquat+Diuron.....	53
4.4 Anatomia foliar.....	63
4.4.1 Controle	63
4.4.2 Paraquat	64
4.4.3 Diuron.....	64
4.4.4 Paraquat+Diuron.....	65
4.5 Ultraestrutura celular	69
4.5.1 Controle	69
4.5.2 Paraquat	69
4.5.3 Diuron.....	70
4.5.4 Paraquat+Diuron.....	71
5. Discussão	77
6. Conclusão	91
7. Referências	92

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Culturas de importância econômica.....	2
Figura 2. Famílias de plantas daninhas resistentes Sítios de ação dos herbicidas na célula vegetal.....	5
Figura 3. Sítios de ação dos herbicidas na célula vegetal.....	8
Figura 4. Micrografia eletrônica de transmissão do cloroplasto das células do mesofilo.....	19
Figura 5. <i>Setaria viridis</i> (L) Beauv acesso A10.1.....	23
Figura 6. Seção transversal da folha de <i>Setaria viridis</i>	24
Figura 7. Variações bioquímicas, anatômicas e ultraestruturais nos subgrupos do metabolismo C ₄	27
Figura 8. Filogenia da família das gramíneas.....	29
Figura 9. Efeito dos herbicidas na morfologia das plantas controle ao longo do tempo.....	38
Figura 10. Efeito do herbicida Paraquat na morfologia das plantas controle ao longo do tempo.....	40
Figura 11. Efeito do herbicida Diuron na morfologia das plantas controle ao longo do tempo.....	42
Figura 12. Efeito do herbicida Paraquat+Diuron na morfologia das plantas controle ao longo do tempo.....	44
Figura 13. Rendimento quântico máximo do FSII, F _V /F _M da folha de <i>Setaria viridis</i> tratadas com diferentes doses de Paraquat.....	46
Figura 14. Rendimento quântico máximo do FSII, F _V /F _M de <i>Setaria viridis</i> tratadas com diferentes doses de Diuron.....	47
Figura 15. Efeito de diferentes doses de Diuron na fluorescência transiente.....	49
Figura 16. Rendimento quântico máximo do FSII, F _V /F _M de <i>Setaria viridis</i> tratadas com diferentes doses de Paraquat+Diuron.....	50
Figura 17. Efeito dos herbicidas na superfície foliar de <i>Setaria viridis</i> 24 HAA.....	55
Figura 18. Efeito dos herbicidas nas células epidérmicas de <i>Setaria viridis</i> 24 HAA.....	56
Figura 19. Efeito dos herbicidas na superfície foliar de <i>Setaria viridis</i> 24 HAA.....	57
Figura 20. Efeito dos herbicidas nos estômatos de <i>Setaria viridis</i> 24 HAA.....	58
Figura 21. Efeito dos herbicidas na superfície foliar de <i>Setaria viridis</i> 96 HAA.....	59
Figura 22. Efeito dos herbicidas nas células epidérmicas de <i>Setaria viridis</i> 96 HAA.....	59
Figura 23. Efeito dos herbicidas na superfície foliar de <i>Setaria viridis</i> 96 HAA.....	60
Figura 24. Efeito dos herbicidas na superfície foliar de <i>Setaria viridis</i> 96 HAA.....	60
Figura 25. Efeito dos herbicidas na área dos estômatos 24 HAA.....	61
Figura 26. Efeito dos herbicidas no comprimento, largura e ostíolo 24 HAA.....	61
Figura 27. Efeito do Diuron na área dos estômatos 96 HAA.....	62
Figura 28. Efeito dos herbicidas na área dos estômatos 96 HAA.....	63
Figura 29. Efeito dos herbicidas na anatomia foliar de <i>Setaria viridis</i> 24 HAA.....	66
Figura 30. Efeito dos herbicidas na anatomia foliar de <i>Setaria viridis</i> 96 HAA.....	67
Figura 31. Efeito dos herbicidas na espessura do mesofilo, epiderme adaxial e abaxial.....	68
Figura 32. Efeito do Diuron na espessura do mesofilo, epiderme adaxial e abaxial 96 HAA.....	68

Figura 33. Efeito dos herbicidas nas células do mesofilo e da bainha vascular.....	72
Figura 34. Efeito dos herbicidas na ultraestrutura celular dos cloroplastos da bainha vascular e do mesofilo 24 HAA	73
Figura 35. Efeito do herbicida Diuron após 24 HAA na organização ultraestrutural das membranas tilacoide dos cloroplastos da bainha vascular e do mesofilo.....	74
Figura 36. Efeito dos herbicidas na ultraestrutura celular dos cloroplastos da bainha vascular e do mesofilo 96 HAA	75
Figura 37. Efeito dos herbicidas na parede de celular da epiderme	76
Figura 38. Efeito do Diuron na parede de celular da epiderme em 96 HAA	76
Tabela 1: Herbicidas e suas respectivas doses aplicadas em <i>Setaria viridis</i>	32
Tabela 2. Parâmetros do teste OJIP avaliados	34
Tabela 3 Avaliação de injúrias visuais em <i>Setaria viridis</i> após a aplicação dos herbicidas Paraquat, Diuron, Paraquat+Diuron	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

ACCase – Acetil Coenzima A Carboxilase
ALS - Acetolactato sintase
ATP – Adenosina tri-fosfato
FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
Fd – Ferredoxina
FSI – Fotossistema I
FSII – Fotossistema II
HAA – Horas após a aplicação
HRCA – Comitê de Ação de Resistência à Herbicida
MET – Microscopia eletrônica de transmissão
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
MO – Microscopia ptica
NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADP Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NTSR - Resistência fora do sítio alvo
PC – Plastocianina
PQ – Plastoquinona
PQH2 – Plastohidroquinona
ROS- Espécies reativas de oxigênio
SINDVEG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal
TCE – Transferência cíclica de elétrons
TLE – Transferência linear de elétrons
TSR - Resistência ao sítio-alvo
VLCFA - cidos graxos de cadeia muito longa
WSSA - Sociedade de Ciências de Ervas Daninhas da América

1. Introdução

1.1 Agricultura

A população humana segue em constante crescimento e estima-se que até o fim do século, a população mundial esteja entre 9.6 a 12.3 bilhões de habitantes, com aumento mais proeminente nos continentes Africano e Asiático (GERLAND *et al.*, 2014). O aumento do número de pessoas torna necessário aprimorar e intensificar as práticas agrícolas sustentáveis ao redor do mundo, visando impulsionar a produção alimentícia para combater a fome e manter o estado de bem-estar básico humano. Atualmente, avalia-se que a produção global de alimentos precisa aumentar entre 60 a 110% para atender a demanda estimada para os próximos 50 anos (ROCKSTRÖM *et al.*, 2017).

Nos últimos trinta anos observa-se a proeminência do cultivo mundial de cana-de-açúcar, representando quase 1.8 milhão de toneladas no ano de 2017, seguido de milho (1.1×10^6 ton), arroz e trigo (750×10^6 ton). A relevância mundial das culturas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*) e trigo (*Triticum aestivum sp.*) pode ser evidenciada pelo expressivo aumento na produção em toneladas entre os anos de 1980 e 2017 (FAOSTAT, 2019). Um panorama similar pode ser observado na agricultura nacional, na qual a produção agrícola está concentrada principalmente na produção de cana-de-açúcar (758×10^6 ton/ano), soja (115×10^6 ton/ano) e do milho (97×10^6 ton/ano), tornando o Brasil um expoente na produção dessas culturas (Fig. 1) (HIRAKURI& LAZZAROTO, 2014; VARGAS *et al.*, 2006, AMIS, 2019; FAOSTAT, 2019).

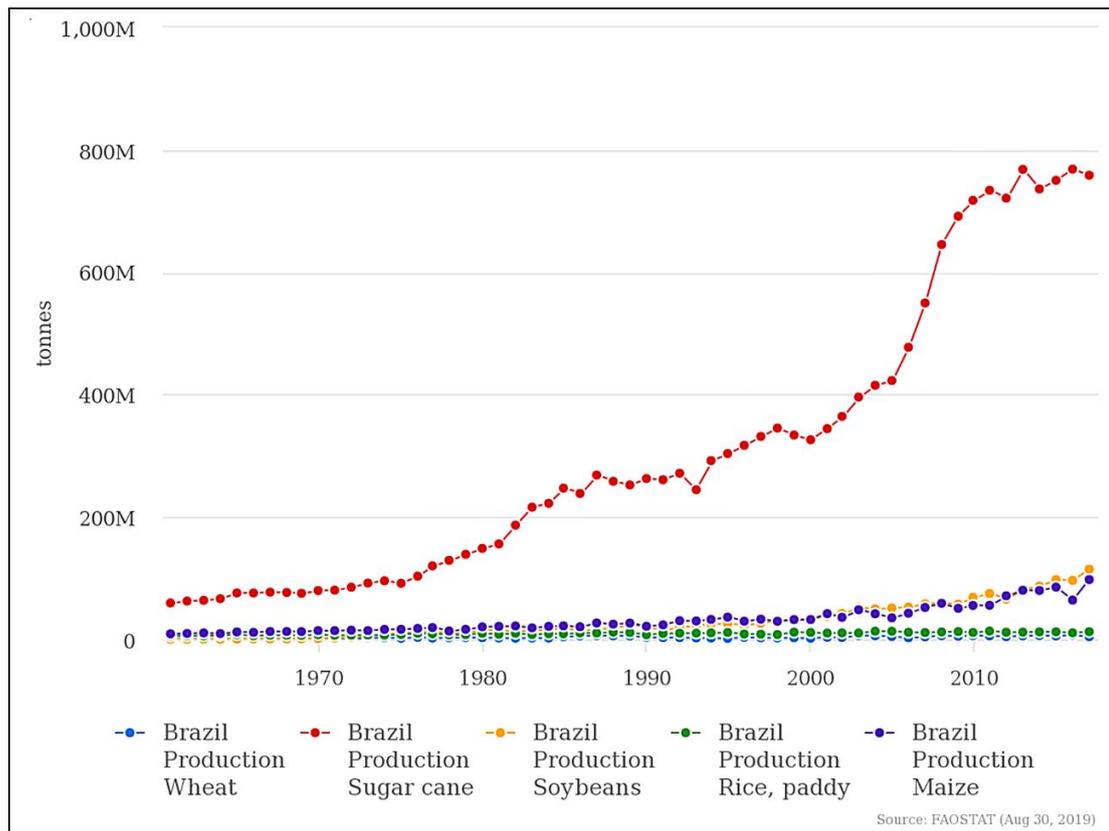


Figura 1. Culturas de importância econômica. Em 2017 a produção nacional de cana-de-açúcar atingiu 758 milhões de toneladas, a soja 115 e o milho 97 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2019)

Em virtude da importância econômica supramencionada, diversos fatores podem gerar impactos prejudiciais à produtividade desse setor, destacando-se entre eles os fatores abióticos e bióticos. Os fatores abióticos mais impactantes incluem seca, contaminação por metais pesados, temperaturas extremas e salinidade. Enquanto, os fatores bióticos são caracterizados principalmente pela presença de insetos praga, microrganismos patogênicos, plantas daninhas (FAROOQ *et al.*, 2008, KALLIS *et al.*, 2008). Os fatores bióticos podem afetar principalmente a produtividade das culturas por meio da redução na biomassa vegetal e na taxa fotossintética, aceleração do processo de senescência foliar, competição por luz, por carboidratos e por nutrientes solúveis, além de se relacionar ao consumo de tecidos vegetais e redução do balanço hídrico e nutricional (BOOTE, 1983).

Estima-se que milho, soja, arroz, trigo, cevada, batata, algodão e café podem sofrer uma perda média de 68% devido aos danos ocasionados pela presença de fatores bióticos como pragas, sendo 18% das perdas representadas por insetos, 16% relacionados a diferentes patógenos e 34% devido à presença de plantas daninhas (OERKE, 2006). Entre os anos 2001 e 2003 a presença de plantas daninhas ocasionou perdas que alcançaram 23% na produção mundial de trigo, 37% em arroz, 40% em milho e 37% em soja (OERKE, 1999, 2006). Na agricultura nacional, em culturas de cana de açúcar a presença de plantas daninhas pode tornar a produção 30% mais onerosa, além de provocar perdas de 85% no peso dos colmos das plantas (BLANCO, 2003). A presença de braquiária (*Brachiaria decumbens*) e capim colonião (*Panicum maximum*) resultaram na redução de até 40% na produtividade de colmos de cana de açúcar (KUVA et al., 2003). Em milho, o rendimento de grãos foi 17% menor nas áreas onde houve competição com plantas daninhas (GAZZIERO et al., 2012).

1.2 Plantas daninhas

As plantas daninhas representam uma ameaça universal para a agricultura, sendo definidas como plantas altamente competitivas que se adaptam constantemente aos sistemas de cultivo e causam perdas e danos à colheita (YUAN *et al.*, 2006). Este conceito não é restrito a um grupo vegetal e pode ser aplicado a qualquer planta que interfira negativamente na capacidade produtiva da espécie cultivada (HARLAN, 1975). Essas plantas são capazes de competir por água, luz e nutrientes com outras culturas; liberar exsudatos radiculares e lixiviados foliares tóxicos às lavouras; além de criar um ambiente favorável à proliferação de pragas (artrópodes, ácaros, patógenos e outros), o que interfere no processo normal de colheita e ocasiona a contaminação do produto (FAO, 2007).

O manejo de plantas daninhas em áreas agrícolas utiliza diferentes procedimentos, que incluem práticas preventivas e diferentes formas de controle que ao serem utilizados

de forma integrada garantem o controle eficiente associado a uma diminuição do impacto ambiental (NUNES *et al.*, 2010). No entanto, a escolha do tipo de manejo utilizado também depende de fatores como extensão e topografia da área a ser controlada, além do perfil do produtor rural. O controle pode ser cultural, mecânico, físico, biológico e químico. A utilização de práticas preventivas, evitando a introdução de novos propágulos na área cultivada, com o uso de sementes e mudas certificadas, esterco isento de propágulos, limpeza de máquinas e implementos agrícolas, presença de margens, cercas e canais de irrigação, além de isolamento e quarentena de áreas e animais favorecem o manejo eficiente de plantas daninhas. O controle químico caracterizado pela utilização dos herbicidas destaca-se dentre as demais metodologias, especialmente em áreas agrícolas extensas, em face a combinação de baixo valor econômico, alto rendimento operacional e eficiente controle das plantas daninhas (FONTES *et al.*, 2003, FAO, 2006).

As principais espécies de plantas daninhas pertencem as famílias Poaceae (82 espécies), Asteraceae (42 espécies), Brassicaceae (22 espécies), Cyperaceae (12 espécies) e Amaranthaceae (11 espécies), sendo que, só a família Poaceae representa 32% desse total (Fig. 2). Mundialmente, ao analisarmos as 15 plantas daninhas mais resistentes a diferentes mecanismos de ação dos herbicidas, 8 pertencem a família Poaceae. Esse elevado número de relatos é determinante para que as gramíneas sejam consideradas

muito propensas ao desenvolvimento de resistência a herbicidas em comparação com outras famílias (HEAP, 2019).

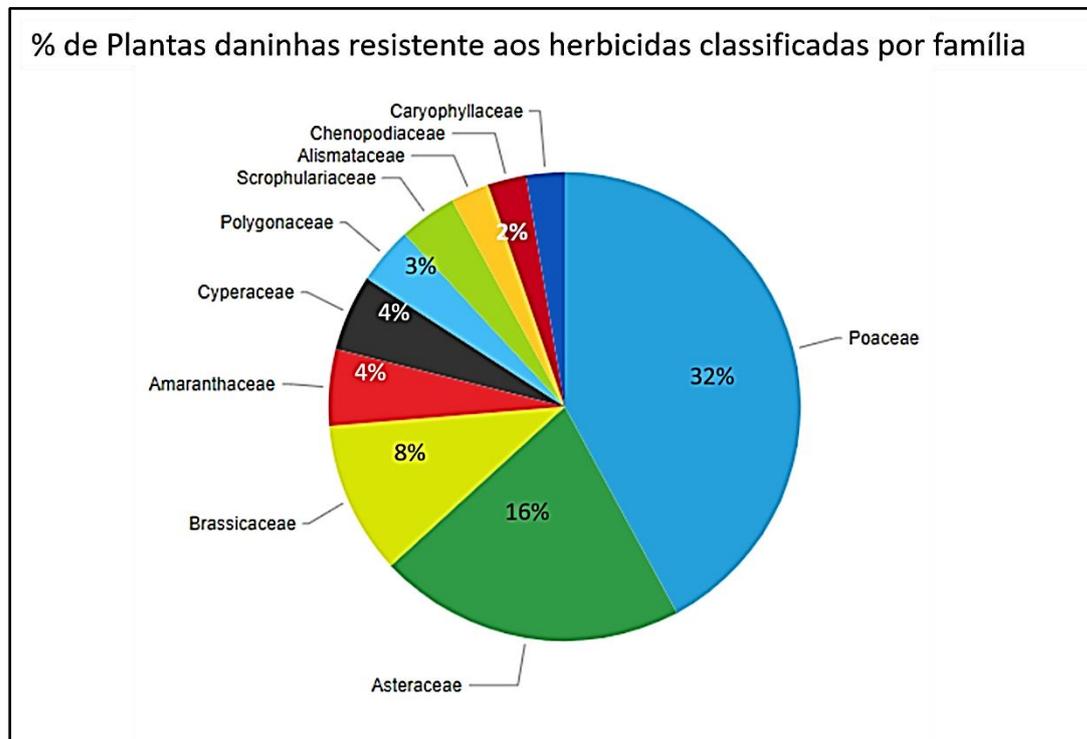


Figura 2. Famílias de plantas daninhas resistentes. Poaceae é a família com maior número de espécies de plantas daninhas resistentes a herbicidas (Heap, I. 2019).

Dentre as espécies de plantas daninhas pertencentes à família Poaceae destacam-se *Digitaria spp*, *Brachiaria spp*, *Cynodon spp*, *Cynosurus spp*, *Setaria spp*. Tais espécies apresentam metabolismo fotossintético C₄, possuem maior habilidade para retirar do meio ambiente os fatores necessários ao seu crescimento e desenvolvimento, principalmente quando estão em competindo com plantas com metabolismo fotossintético C₃, além de apresentarem maior eficiência na utilização de CO₂. Essas características influenciam diretamente o aumento da taxa de crescimento, melhora no aproveitamento da energia luminosa e incremento na eficiência da produção de biomassa seca mesmo em situações com restrição hídrica. Alguns exemplos de plantas daninhas que possuem metabolismo fotossintético C₄ e podem competir com culturas que possuem metabolismo C₃ são: capim

amargoso, capim mão de sapo, capim marmelada e grama seda (BRIGHENTI; OLIVEIRA 2011).

1.3 Herbicidas

Defensivos agrícolas são comumente utilizados na agricultura e podem ser tanto de natureza química quanto biológica. Destacam-se pela efetividade no combate a fungos (fungicidas), bactérias (bactericidas), plantas invasoras (herbicidas) e insetos (inseticidas). De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDVEG) 60% dos defensivos agrícolas utilizados em 2017 no Brasil são herbicidas, enquanto os inseticidas e fungicidas ocupavam a segunda colocação com 15% cada. Ainda em 2017, este segmento correspondeu a 35% da venda de defensivos agrícolas, com um faturamento de nove bilhões de dólares. Sendo a utilização na cultura da soja responsável por mais da metade dessa receita com 52% do total ou 4.6 bilhões de dólares. A cultura de cana-de-açúcar ocupa o segundo lugar, sendo responsável por 12% do faturamento do setor de defensivos correspondendo a aproximadamente 1,04 bilhão de dólares. Na sequência, tem-se as culturas do milho (10%), algodão (7%) e café (3%) onde o uso de herbicidas é proeminente, impactando o custo de produção(SINDIVEG, 2017).

A aplicação de herbicidas pode ocorrer tanto em pré como na pós-emergência de plantas invasoras. Quando aplicados na pré-emergência, visam combater as sementes ou plantas em estágio inicial de desenvolvimento, o que permite a eliminação da competição entre as plantas invasoras e a cultura de interesse, evitando perda de rendimento. O sucesso no efeito da aplicação dos herbicidas pré-emergentes tem relação com a umidade relativa no momento da aplicação, a presença de chuva após a aplicação para sua ativação, variações de temperatura, tipo de solo e espécies daninhas a serem controladas (VARGAS; ROMAN, 2006). A efetividade dos herbicidas pós-emergentes também está

sujeita às variações do ambiente, tais como: temperatura, umidade, velocidade do vento e intensidade de chuva. Além disso, essa prática proporciona eficiência no controle, melhor custo-benefício e principalmente maior seletividade (FONTES *et al.*, 2003; VARGAS e ROMAN, 2006). A seletividade do herbicida define sua ação exclusivamente em plantas alvo, sendo este normalmente metabolizado ou degradado pela cultura de interesse (ROMAN *et al.*, 2005).

1.3.1 Classificação e mecanismo de ação dos herbicidas

O mecanismo de ação de herbicidas é um dos fatores mais efetivos e capazes de controlar o desenvolvimento de espécies indesejadas em grandes cultivos. A classificação dos herbicidas de acordo com seus grupamentos químicos e mecanismos de ação segue a normativa do Comitê de Ação de Resistência à Herbicida (HRAC, *Herbicide Resistance Action Committee*) e reúne 25 grupos (Fig. 3) (HEAP, 2019; DÉLYE; JASIENUK; LE CORRE, 2013).

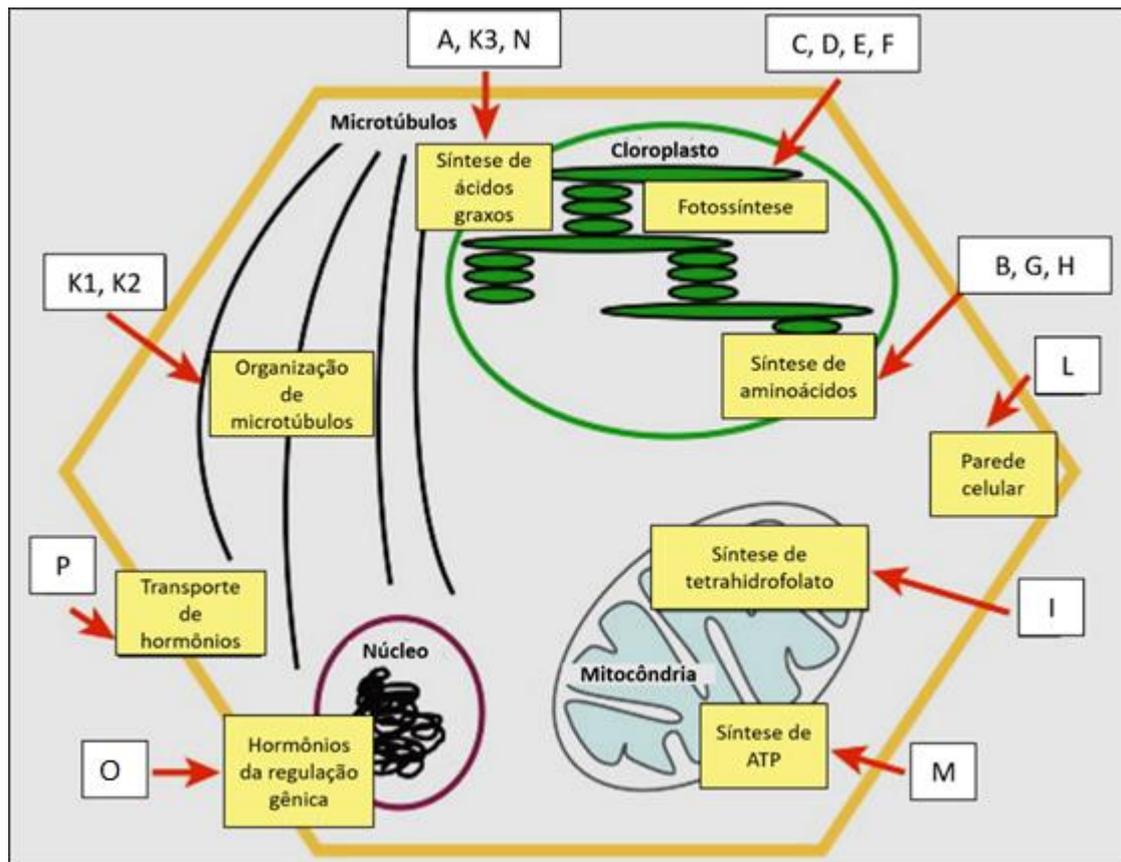


Figura 3. Sítios de ação dos herbicidas na célula vegetal. (A-P) Cada letra representa o grupo dos herbicidas de acordo com seus grupamentos químicos e mecanismos de ação seguindo o padrão do Comitê de Ação de Resistência à Herbicida (DÉLYE et al., 2013).

Os grupos A, K3 e N reúnem herbicidas que atuam nos processos relacionados à síntese de lipídeos. Os herbicidas do grupo A (ariloxifenoxipropionatos e ciclohexadionas) são responsáveis por ocasionar inibição da enzima Acetil Coenzima A Carboxilase (ACCase), enzima responsável por dosar o ritmo da biossíntese de lipídios e sua inibição resulta na paralisação do crescimento das raízes e da parte aérea (AGOSTINETTO *et al.*, 2002; DOTRAY *et al.*, 1993). Os herbicidas do grupo K3 (acetamida, cloroacetamida) inibem a síntese de ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA, Very Long Chain Fatty Acids). A membrana plasmática é rica em VLCFA e, quando ausente determina a perda da estabilidade e o rompimento da membrana, ocasionando extravasamento celular e conduzindo a planta à morte (MATTHES;

BÖGER, 2002). Os herbicidas do grupo N (benzofurano, tiocarbamato) agem nos estágios iniciais do crescimento da plântula, inibem a biossíntese de ácidos graxos e lipídios ocasionando a redução da deposição de cera epicuticular, cutina e suberina, além de afetar a biossíntese de proteínas, isoprenoides e flavonoides (BALDWIN *et al.*, 2003; COBB; READE, 2010; GRONWALD, 1991).

Os herbicidas pertencentes aos grupos C, D, E e F, estão relacionados com os processos de fotossíntese. Os herbicidas do grupo C (Diuron, fenuron) atuam inibindo a fotossíntese pelo complexo do fotossistema II, por meio do bloqueio do transporte de elétrons, interrompendo a síntese de ATP e de NADPH e a fixação de CO₂, etapa necessária para o crescimento das plantas. Os herbicidas do grupo D (Paraquat e diquat), captam elétrons provenientes do fotossistema I, impossibilitando a produção de NADPH⁺, ocasionando a produção de radicais livres tóxicos à planta. No grupo E (acifluorfen, fomesafen) os herbicidas inibem a enzima protoporfirinogênio oxidase, presente nos cloroplastos e responsável pela produção da molécula precursora da clorofila (protoporfirina IX). Os herbicidas do grupo F (clomazone) podem bloquear as vias da síntese de carotenoides, inibindo a fitoenodesaturase, ou a síntese de plastoquinonas, inibindo o hidroxifenilpirúvico, ocasionando sintomas de clorose nas plantas (COBB; READE, 2010; KIRKWOOD, 1991).

Os herbicidas pertencentes aos grupos B, G, H atuam nas etapas relacionadas à síntese de aminoácidos. No grupo B (clorimuron, imazamox) os herbicidas inibem a acetolactato sintase (ALS), enzima chave na biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada (isoleucina, leucina e valina). Os herbicidas do grupo G (glifosato) inibem a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase ocasionando a depleção dos aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) todos necessários para a síntese protéica ou para as vias biossintéticas que levam ao crescimento. Os herbicidas

do grupo H (glufosinato, bialafos) inibem a atividade da glutamina sintetase, enzima que converte glutamato e amônia em glutamina, ocasionando o acúmulo de amônia na planta, que irá inibir as reações do fotossistema I e do fotossistema II (COBB; READE, 2010; KIRKWOOD, 1991).

Os herbicidas pertencentes aos grupos K1 (trifluralina, pendimetalina) e K2 (carbutamida, cloroprofame) ligam-se à tubulina e inibem a polimerização de microtúbulos, levando a uma perda da estrutura e função dos microtúbulos, impedindo o alinhamento e a separação dos cromossomos durante a mitose. Além disso, os microtúbulos também funcionam na formação da parede celular e sua inibição pode causar o inchaço observado das pontas das raízes, pois as células nessa região não se dividem nem se alongam (COBB; READE, 2010; KIRKWOOD, 1991).

Os herbicidas do grupo L (isoxabeno, cloreiamida) atuam na parede celular inibindo a síntese de celulose. A inibição desse processo pode ocasionar o enfraquecimento das paredes celulares causando expansão celular desordenado. Devido a isso, a planta apresenta crescimento anormal seguido de morte (COBB; READE, 2010). O grupo I (asulam) atua na síntese de tetra hidrofolato, inibindo a ação enzimática da 7,8-di-hidropteroato sintase, enzima envolvida na síntese de ácido fólico necessária para a biossíntese de purina. A consequente inibição pode interferir na mitose e também a diminuir a síntese de proteínas e RNA, acarretando na redução da produção de aminoácidos e nucleotídeo (KIRKWOOD, 1991). O grupo M (dinoseb e dinoterb) atua na síntese de ATP, são herbicidas que separam o processo de fosforilação oxidativa causando quase imediata ruptura da membrana e necrose. O grupo O (2,4-D, dicamba) é formado por herbicidas mimetizadores de auxina. A ação desses compostos afeta a plasticidade da parede celular e o metabolismo dos ácidos nucléicos. Acredita-se que estes compostos acidificam o pH da parede celular ocasionando alongamento celular além de

umentar a atividade de enzimas responsáveis pelo afrouxamento da parede celular. O grupo P (naptalam) atua no transporte de hormônios, inibem o transporte de auxina provocando um acúmulo anormal nas regiões meristemáticas da parte aérea e das raízes, interrompendo o equilíbrio das auxinas necessárias para o crescimento das plantas (COBB; READE, 2010; KIRKWOOD, 1991).

1.3.2 Resistência

O uso intensivo e indiscriminado de herbicidas constitui um dos fatores que conduzem a seleção de biótipos resistentes. Considera-se biótipo, um grupo de indivíduos com carga genética semelhante, pouco diferenciado da maioria dos indivíduos da população (KISSMANN, 1996), mas que desenvolveu mecanismos de resistência a um ou mais herbicidas. Plantas daninhas podem desenvolver resistência a um mecanismo de ação isoladamente ou a diferentes mecanismos de ação sendo caracterizada como resistência múltipla (POWLES; PRESTON, 1995).

A Sociedade de Ciências de Ervas Daninhas da América (WSSA, *Weed Science Society of America* do inglês) define parâmetros para resistência e tolerância aos herbicidas. Para a WSSA a resistência a herbicidas é a capacidade hereditária de uma planta para sobreviver e se reproduzir após a exposição à uma dose de herbicida normalmente letal para o tipo selvagem. Para uma planta, a resistência pode ser natural ou induzida por técnicas como engenharia genética ou seleção de variantes produzidas por cultura de tecidos ou mutagênese. A tolerância ao herbicida é a capacidade inerente de uma espécie em sobreviver e se reproduzir após o tratamento com herbicida. Isto significa, que não houve seleção ou manipulação genética para tornar a planta tolerante, logo, é uma característica intrínseca da planta (*“Technology Notes”*, 1998).

As plantas daninhas podem sobreviver à aplicação de herbicidas devido a um ou mais mecanismos de resistência. Os mecanismos podem ser divididos em resistência ao sítio-alvo (TSR- *Target-site resistance*) ou mecanismos de resistência fora do sítio alvo (NTSR- *Non-target-site resistance*). O TSR está associado a qualquer mutação nas sequências nucleotídicas que codificam a enzima alvo, para o herbicida ou superexpressão do gene que codifica a enzima alvo. O NTSR atua no metabolismo de herbicida ou mecanismos que influenciam a translocação, exclusão ou sequestro de herbicida de organelas celulares (DÉLYE; JASIENUK; LE CORRE, 2013). Além disso, o processo de resistência aos herbicidas também pode ser ocasionado por fatores operacionais (dose do herbicida, habilidade do operador, maquinaria) (POWLES; YU, 2010). A resistência das plantas daninhas ao herbicida pode ser determinada através do C_{50} , ou seja, a dose de herbicida necessário para controlar 50% da população, e GR_{50} , constituído pela dose de herbicida em gramas de ingrediente ativo por hectare capaz de proporcionar 50% de redução do crescimento da planta daninha (CHRISTOFFOLETI, 2002).

No mundo estão registradas 254 espécies de plantas daninhas resistentes. Estas desenvolveram resistência a 23 dos 26 sítios de ação conhecidos totalizando 163 diferentes herbicidas (HEAP, 2019). No cenário nacional, até o momento 50 plantas daninhas foram relatadas como resistentes aos mecanismos de ação dos herbicidas. Destas, oito apresentam resistência a múltipla, ou seja, a planta adquiriu resistência a dois ou mais herbicidas de diferentes mecanismos de ação (HEAP, 2019).

1.3.4 Absorção e Translocação

Após a aplicação, os herbicidas precisam atingir o seu sítio de ação. Entretanto, para que isso ocorra os herbicidas precisam ultrapassar algumas barreiras externas presentes na folha ou no colmo, quando aplicados na folhagem, Especificamente, para os

herbicidas aplicados na superfície foliar existem três barreiras importantes que precisam ser vencidas pelas moléculas para entrar na célula: cutícula, parede celular e a membrana plasmática (ROMAN *et al.*, 2005).

À medida que a gotícula contendo as moléculas de herbicida se deposita na superfície foliar a primeira barreira que precisa ser ultrapassada é a cutícula. Nas folhas e nos colmos a cutícula é cerosa, de forma que herbicidas hidrofílicos apresentam dificuldade para ultrapassar essa camada. Em contraste, herbicidas com características hidrofóbicas são capazes de atravessar essa barreira. Após ultrapassar a cutícula, o herbicida encontra a segunda barreira à absorção, o apoplasto. Nesta região ocorre o oposto da cutícula, ou seja, compostos hidrofílicos atravessam facilmente essa barreira, enquanto os hidrofóbicos apresentam dificuldade para atravessar. Adicionalmente, a água move-se através do apoplasto em seu caminho para as folhas, onde é, na sua maioria, perdida pela transpiração, levando juntamente os compostos hidrofílicos para as bordas das folhas. A última barreira que o herbicida precisa atravessar para atingir seu sítio de ação é a membrana celular, barreira formada majoritariamente por fosfolipídios e algumas proteínas. Nesta etapa, os herbicidas hidrofílicos atravessam lentamente, enquanto os hidrofóbicos penetram facilmente a membrana celular. Após ultrapassar a membrana celular, as moléculas hidrofílicas se inserem e dispersam no citoplasma, o mesmo não ocorre com as moléculas hidrofóbicas. A alternância de camadas aquosas e oleosas impõe dificuldades na absorção, tanto para os herbicidas hidrofílicos como para os hidrofóbicos. Os herbicidas com melhor/maior movimentação na planta apresentam comportamento intermediário. Tais herbicidas possuem propriedades intermediárias, tendo solubilidade que lhe permite se dissolverem, em certa proporção, tanto em óleo como em água. (ROMAN *et al.*, 2005).

Os herbicidas podem se mover por duas vias, simplástica e apoplástica. A via simplástica ocorre no floema, composto por células vivas, transporta as soluções para todas as partes da planta tanto no sentido ascendente como no descendente. A via de transporte apoplástica ocorre no xilema, composto por células mortas, é uma corrente com sentido ascendente na planta que transporta a água e os nutrientes nela dissolvidos, absorvidos do solo, via raízes, até a parte aérea (ROMAN *et al.*, 2005).

Para que o herbicida se mova pela a via simplástica o mesmo precisa apresentar características de solubilidade intermediária e/ou ter a natureza de ácidos fracos. Tanto a solubilidade quanto a natureza ácida afetam a translocação do herbicida. Em contraste, para o herbicida se mover pela via apoplástica e atingir a parte aérea, o mesmo deve ser solúvel em água. Portanto, os herbicidas aplicados ao solo que necessitam chegar à parte aérea devem mover se via simplástica, sendo necessariamente solúveis em água. No caso dos herbicidas que são aplicados na superfície foliar aplicação de herbicidas que e se movem via simplástica a tendência é o produto ser transportado para as bordas foliares (ROMAN *et al.*, 2005).

1.3.5 Diuron

O Diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) é um herbicida não seletivo, pertencente ao grupo químico das ureias (C2), geralmente utilizado na pós-emergência para interromper o desenvolvimento de plântulas de espécies invasoras em culturas de algodão, café, cana de açúcar e citros (ADAPAR, 2019). O primeiro caso de resistência a Diuron foi no Havaí em 1987 envolvendo *Chloris barbata*. O último relato de resistência a Diuron ocorreu em 2017 no Brasil envolvendo *Conyza sumatrensis*, sendo relatados até a presente data nove casos envolvendo resistência a Diuron (HEAP, I 2019). Esse herbicida atua associando-se ao local de ligação da quinona ao sítio B (Q_B) presente na proteína D1 do fotossistema II, bloqueando, assim, o transporte de elétrons de Q_A para

Q_B. Este processo impede a produção de ATP e redução do NADP⁺ inibindo a fixação de CO₂. A incapacidade de reoxidar a Q_A promove a formação de clorofila no estado tripleto, que interage com o oxigênio do estado fundamental para formar oxigênio singleto. Tanto a clorofila tripleto como o oxigênio singleto podem extrair hidrogênio de lipídios insaturados, produzindo um radical lipídico e iniciando uma cadeia de reação de peroxidação lipídica. Lipídeos e proteínas são atacados e oxidados, resultando em perda de clorofila, carotenoides, e desintegração das membranas ocasionando extravasamento do conteúdo celular e perda de organelas (KIRKWOOD, 1991; NAYLOR, 2002).

A atividade de solo dos herbicidas inibidores do FSII é variável, Diuron é um herbicida não-ionizável relativamente persistente em solos (INOUE et al., 2008), apresenta solubilidade em água suficiente para favorecer a translocação via apoplástica, principalmente pelo fluxo de água de transpiração plantas. Diuron pode ser facilmente absorvido através de soluções pelas raízes das plantas e transportado para caules, pecíolos foliares e folhas (BÖRNER 1995; SMITH AND SHEETS 1965). Quando o Diuron é aplicado diretamente na folha o herbicida é transportado via apoplástica para a nervura principal e lateral da folha, posteriormente o herbicida é absorvido pelas células das regiões intercostais (LICHTENTHALER et al., 2013). Os sintomas destes herbicidas são caracterizados por clorose internervural e nas bordas foliares, que progridem, da borda para o centro, para necrose generalizada da folha. Tais sintomas foliares podem progredir rapidamente quando, após a aplicação do herbicida, as plantas são expostas a luz (ROMAN *et al.*, 2005).

1.3.6 Paraquat

Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium) é um herbicida pertencente ao grupo químico bipilidílio (D). Devido a sua característica não seletiva, Paraquat é comumente utilizado em pré-emergência com o objetivo de preparar a terra para o plantio ou para

controlar ervas daninhas em mais de 100 culturas. Apresenta largo espectro de utilização nas principais culturas brasileiras que incluem milho, arroz, soja, trigo, batatas, maçãs, laranjas, bananas, café, chá, cacau, algodão, óleo de palma e cana-de-açúcar (PIZZUTTI *et al.*, 2016).

O primeiro caso de resistência envolvendo Paraquat foi no Japão em 1980 com *Erigeron philadelphicus L*, o caso mais recente foi em 2018 na Austrália envolvendo *Conyza sumatrensis*. Relatos indicam a presença de 70 casos distintos de resistência de plantas a ação do Paraquat (HEAP I, 2019). Paraquat é extremamente perigoso e foi proibido em 32 países incluindo a União Europeia e Coreia do Sul, por causa de sua toxicidade e frequência de envenenamentos (GLAIZAL *et al.*, 2013; MYUNG *et al.*, 2015; SARTORI; VIDRIO, 2018). No Brasil, o uso de Paraquat está proibido nas culturas de abacate, abacaxi, aspargo, beterraba, cacau, coco, couve, pastagens, pêra, pêsego, seringueira, sorgo e uva. A partir de 22 de setembro de 2020 seu uso será proibido no país (BRASIL; 2017).

O Paraquat atua interagindo com a ferredoxina e compete com o NADP^+ como acceptor de elétrons. Quando o Paraquat ganha um elétron, ele é rapidamente reduzido e transferido ao oxigênio molecular, formando o ânion superóxido (O_2^-). O superóxido produz peróxido de hidrogênio dentro do cloroplasto e estes dois compostos interagem para formar radicais hidroxila na presença de um catalisador, o íon ferro. Os radicais hidroxila são muito prejudiciais, levando à destruição dos componentes celulares e, conseqüentemente, à morte rápida das plantas (NAYLOR, 2002).

O Paraquat é uma molécula com alta solubilidade em água, que apresentam carga positiva, ligam-se fortemente aos coloides do solo e não são classificados como ácidos fracos. As moléculas adsorvidas aos coloides do solo ficam indisponíveis aos

microrganismos e às plantas. Por isso, essas moléculas não possuem atividade de solo e não lixiviam. O Paraquat é rapidamente absorvido pelas folhas das plantas, não sendo afetados por chuvas que ocorram duas horas após a aplicação. Devido à forte adsorção à argila e à matéria orgânica, essas moléculas não são absorvidas pelas raízes das plantas. A translocação é limitada exclusivamente via apoplástica, de forma ascendente. A rápida ação dessas moléculas limita a sua própria movimentação (ROMAN *et al.*, 2005).

Estudos de absorção foliar mostraram que a cutícula da planta não é um impedimento à absorção do Paraquat (BISHOP *et al.*, 1987). Geralmente, a absorção é rápida e a absorção máxima pode chegar a 90% ou mais (SOAR *et al.*, 2003). A translocação do Paraquat, por outro lado, é fortemente influenciada pelas condições de luz após a aplicação. Plantas colocadas imediatamente sob condições de luz após a aplicação de Paraquat exibem movimento restrito de Paraquat. No escuro, no entanto, o Paraquat é mais móvel devido aos impactos relativamente mais lentos desse herbicida dependente de luz nos elementos condutores e outros tecidos vegetais (PRESTON *et al.*, 2005). A translocação restrita tem sido reconhecida como um mecanismo de resistência ao Paraquat (YU *et al.*, 2004).

O sintoma de toxicidade deste herbicida pode ser observado poucas horas após a aplicação, principalmente se as plantas estiverem expostas à incidência direta do sol. Nos pontos onde o herbicida atinge o tecido vivo surgem, em poucas horas, manchas encharcadas que, em até três dias após a aplicação, progridem para necrose. Se após a aplicação a planta for exposta a baixa incidência de luz, o herbicida tende a se translocar formando manchas necróticas maiores e desuniformes, ou, até mesmo, necrosando toda a folha (ROMAN *et al.*, 2005).

1.4 Fotossíntese

A fotossíntese é um processo metabólico constituído por duas etapas, a fotoquímica e a de carboxilação, que proporciona a conversão da energia luminosa em energia química em organelas específicas denominadas cloroplastos (SANDELIUS; ARONSSON, 2009; WISE, 2006). Os cloroplastos geralmente apresentam uma morfologia discoide com comprimento de 5-10 μ m, largura de 2-5 μ m e são delimitados por um envelope constituído de duas membranas distintas que envolvem o estroma. Este é geralmente claro, repleto de uma rede de membranas altamente organizadas, capazes de adaptar-se continuamente às mudanças nas condições ambientais, os tilacoides (ROTTET; BESAGNI; KESSLER, 2015).

As membranas tilacoides podem estar empilhadas e formar uma estrutura denominada granum (grana no plural) ou podem estar interligadas por lamelas não empilhadas. Os complexos fotoquímicos do fotossistema I (FSI) estão localizados majoritariamente nas membranas tilacoides estromais e o fotossistema II (FSII) estão localizados nos grana, onde ocorrem as reações da etapa fotoquímica (ALLEN; FORSBERG, 2001; GUNNING; STEER, 1996). O fotossistema II interage com o complexo coletor de luz LHCII (*light-harvesting complex II*), que apresenta alta afinidade por si mesmo ocasionando atração lateral e transversal, resultando na formação dos grana. O fotossistema I contém prolongadas projeções na região estromal, devido a isso, são excluídos do interior das pilhas de grana e dos domínios ricos em fotossistema II, (ALLEN; FORSBERG, 2001). O estroma é uma região rica em proteínas solúveis e ribossomos (ROLLAND *et al.*, 2008), sendo sítio das reações bioquímicas da redução do carbono (GUNNING; STEER, 1996) (Fig. 4).

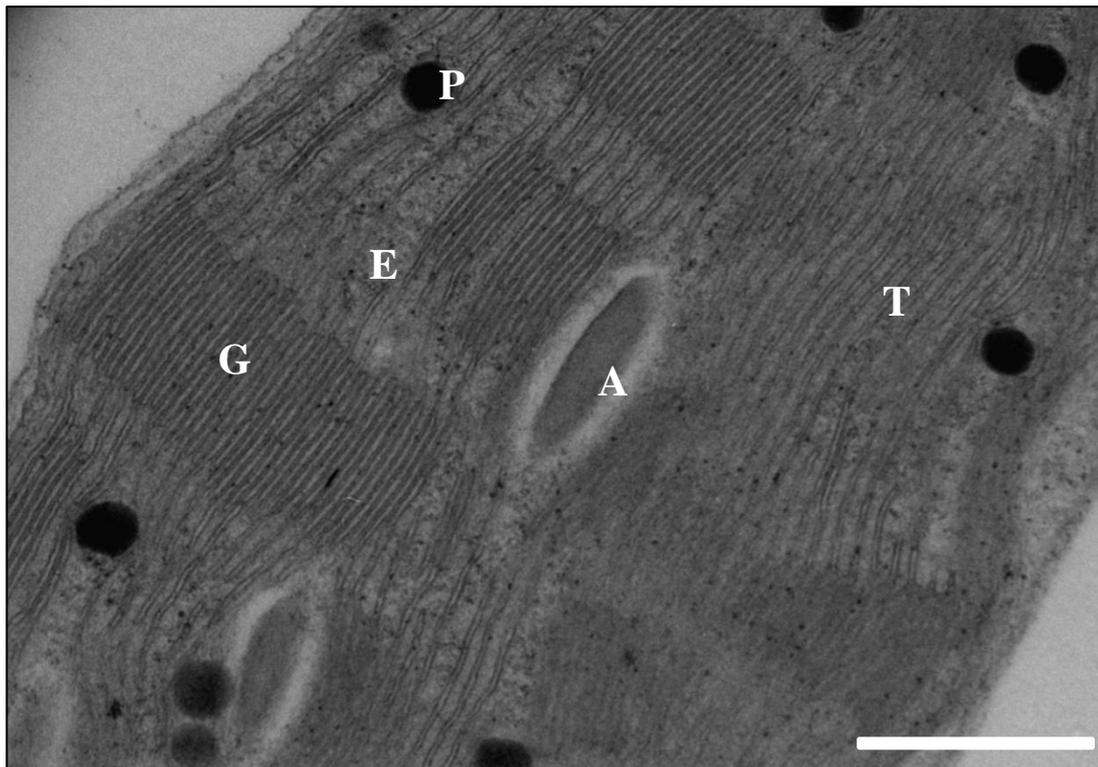


Figura 4. Micrografia eletrônica de transmissão do cloroplasto das células do mesófilo. Detalhes da organização ultraestrutural do cloroplasto da célula do mesófilo. A etapa fotoquímica da fotossíntese ocorre nas membranas do tilacoide (FSI) e nos grana (FSII) enquanto a etapa de carboxilação ocorre no estroma. (A) grão de amido; (P) plastoglóbulo; (G) granum; (T) tilacoide; (E) estroma. Barra de escala = 0,5 µm

Os cloroplastos podem conter estruturas esféricas, com diâmetro que variam entre 30 nm a 5µm, ricas em lipídios e recobertas de proteínas (AUSTIN, 2006). Essas esferas, denominadas plastoglóbulo, são pequenas vesículas associadas à membrana do tilacoides, constituída de grande quantidade de lipídeos e lipoproteínas, apresentando também isoprenoides, tocoferóis, plastoquinonas, carotenoides, proteínas estruturais denominadas plastoglobulinas e enzimas relacionadas ao metabolismo secundário (AUSTIN *et al.*, 2006; BRÉHÉLIN; KESSLER; VAN WIJK, 2007) (Fig. 4).

A formação de agrupamentos de plastoglóbulo ligados estruturalmente e funcionalmente à membrana dos tilacoides, possibilitando o transporte livre e constante de substâncias intra-cloroplasto, reforçam a ação metabólica e integrada dessas estruturas (BRÉHÉLIN; KESSLER; VAN WIJK, 2007; WECKWERTH, 2003). A quantidade e as

dimensões dos plastoglóbulos nos cloroplastos variam durante seu desenvolvimento e diferenciação e são influenciados por fatores intrínsecos como senescência e estresse oxidativo, assim como por estresses abióticos (BRÉHÉLIN, KESSLER, VAN WIJK, 2007; ROTTET, BESAGNI, KESSLER, 2015). Alterações na concentração de CO₂ (SALLAS *et al.*, 2003) e ozônio, contaminação do solo com metais pesados (PANOU-FILOTHEOU *et al.*, 2001), seca (MUNNE-BOSCH&ALEGRE, 2004) e estresse salino são os principais fatores ambientais que influenciam a biogênese dos plastoglóbulos (SAM *et al.*, 2003).

Os cloroplastos também apresentam estruturas transitórias denominadas grãos de amido, sintetizados como reserva de carbono durante a fase fotoquímica da fotossíntese e, mobilizados como fonte de carbono durante o período da noite (VOZNESENSKAYA *et al.*, 1999). Em plantas C₄, a síntese de grãos de amido tende a se acumular nos cloroplastos da bainha vascular. Entretanto, sob condições de iluminação contínua, os cloroplastos das células do mesofilo também podem apresentar grãos de amido (LEEGOOD, 2017). Quando plantas estão em senescência ou são submetidas a estresses abióticos, a quantidade de grãos de amido pode variar, tanto nos cloroplastos das células da bainha vascular, quanto nos cloroplastos das células do mesofilo (GHOSH *et al.*, 2001; GRIGOROVA *et al.*, 2012; UTRILLAS; ALEGRE, 1997; XU; ZHOU; SHIMIZU, 2009).

A etapa fotoquímica da fotossíntese ocorre concomitantemente em duas regiões distintas: o fotossistema II e o fotossistema I. O fotossistema II (FSII) é um supercomplexo proteico formado por um centro de reação e um grupo de proteínas pigmentares que atuam como um conjunto coletor de luz. O centro de reação é formado por duas proteínas, conhecidas como D₁ e D₂, além do citocromo b-559. Associado às proteínas D₁ e D₂ está o P₆₈₀, um par de moléculas de clorofila *a* especializada que atua

não apenas absorção, mas também como um componente redox, atuando como principal doador de elétrons. As reações no centro de reação do FSII iniciam com a excitação do P₆₈₀, que rapidamente perde um elétron reduzindo o aceptor primário – feofitina, que transfere o elétron de forma sequencial às plastoquinonas (Q_A e Q_B) que estão ligadas ao centro de reação. Enquanto Q_A está fortemente ligada à proteína D₂, Q_B é reversivelmente ligada à D₁. Depois de receber dois elétrons, Q_B-2 vai se combinar com dois prótons do estroma tornando-se uma plastohidroquinona (PQH₂) (Fig. 4C). A plastohidroquinona reduzida desacopla-se da proteína D₁ e, por difusão, entra na porção hidrocarbonada da membrana, onde transfere seus elétrons ao complexo citocromo *b6f* (Cyt**b6f**). A PQH₂ será oxidada pelo Cyt**b6f** e a plastoquinona (PQ) resultante irá retornar para o conjunto de PQ. O complexo Cyt**b6f** é desprovido de pigmentos e catalisa a transferência de elétrons entre o FSII e o FSI (KIRKWOOD, 1991; TAIZ *et al.*, 2017).

O fotossistema I (FSI) recebe elétrons provenientes do FSII, através da plastocianina (PC). Os componentes do centro de reação do FSI estão organizados ao redor de duas proteínas principais, PsaA e PsaB. Os elétrons são transferidos da PC para o P₇₀₀ e daí para um monômero de clorofila (A₀), para uma filoquinona (A₁), para os centros Fe-S, e finalmente para a proteína ferro-enxofre hidrossolúvel ferredoxina (Fd) (TAIZ; ZEIGER, 2009). A flavoproteína associada à membrana, ferredoxina-NADP redutase (FRN), reduz o NADP⁺ a NADPH, completando assim o transporte acíclico de elétrons (KIRKWOOD, 1991; TAIZ *et al.*, 2017).

1.5 *Setaria viridis* (L.) Beauv

O gênero *Setaria*, pertencente à família Poaceae, apresenta distribuição cosmopolita e reúne cerca de 114 espécies presentes principalmente em regiões tropicais

e subtropicais do planeta com representantes nos hemisférios Norte e Sul (WEBSTER, 1993; KELLOGG *et al.*, 2009). *Setaria* é um grupo monofilético da subfamília Panicoideae, constituído por gramíneas perenes ou anuais com aproximadamente 125 espécies, incluindo *Setaria viridis* (L.) Beauv., *S. glauca* (Weigel) Hubb., *S. faberii* Herrm., *S. verticillata* (L.) Beauv., *S. geniculata* (Lamarck) Beauv., *S. italica* (L.) Beauv. Beauv. (WANG *et al.*, 1995).

A família Poaceae compreende diversas espécies com grande interesse econômico, utilizadas na alimentação, na produção de biocombustíveis e na restauração de ecossistemas, como cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e os cereais, incluindo trigo (*Triticum sp.*), milho (*Zea sp.*), cevada (*Hordeum sp.*) centeio (*Secale sp.*), aveia (*Avena sp.*) e sorgo (*Sorghum sp.*).

Setaria viridis é uma gramínea anual de verão nativa da África (região do Mediterrâneo), Ásia temperada (Oriente Médio, China, Japão, Sibéria oriental), Ásia tropical (nordeste da Índia, Nepal, Paquistão) e Europa (GRIN, 2000) (Fig. 5). Foi introduzida várias vezes no Novo Mundo com adaptação local e diferenciação regional no continente norte-americano (WANG *et al.*, 1995; DEKKER, 1996) e no Canadá em 1821 (BLACKSHAW *et al.*, 1981).



Figura 5. *Setaria viridis* (L) Beauv acesso A10.1. Cedido por Nícia Junqueira

Setaria viridis apresenta metabolismo fotossintético C₄ NADP-ME, sendo identificado pela presença de um conjunto de características anatômicas, bioquímicas e ultraestruturais. Anatomicamente, a maioria das plantas com metabolismo C₄ apresenta modificação estrutural em torno dos feixes vasculares, conhecida como anatomia *Kranz* (coroa em alemão). Embora presente na maioria das plantas C₄, a anatomia *Kranz* não é uma estrutura essencial para esse metabolismo fotossintético, podendo ser encontrada nas folhas de plantas com metabolismo fotossintético C₃ (EDWARDS *et al.*, 2001a; SAGE *et al.*, 2014; VOZNESENSKAYA *et al.*, 2001). No gênero *Setaria*, a anatomia de *Kranz* apresenta duas camadas de clorênquima: uma camada interna que circunda os feixes

vasculares, denominada bainha vascular ou perivascular, e uma camada mais externa próxima à epiderme e às cavidades subestomáticas e ordenadas ao redor da bainha vascular de células do mesofilo (EDWARDS e VOZNESENSKAYA, 2011; PAK *et al.*, 1997) (Fig.6).

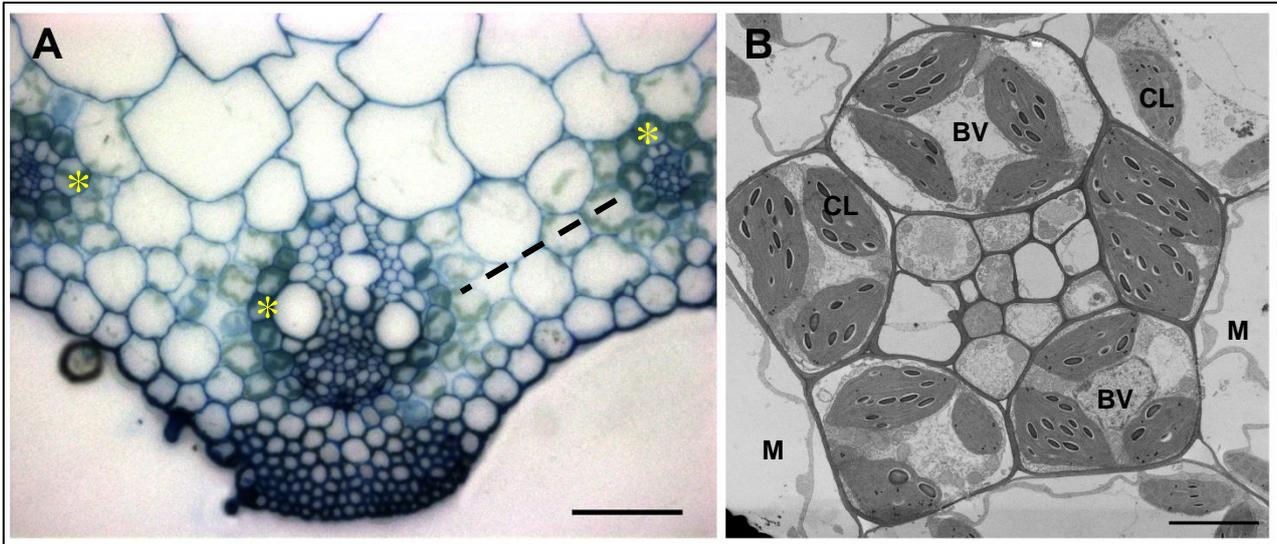


Figura 6. Seção transversal da folha de *Setaria viridis*. (A) Anatomia foliar evidenciando a arquitetura Kranz do feixe vascular. Linha tracejada; tecido do mesofilo entre os feixes vasculares; (*) células da bainha vascular ao redor do feixe vascular. Barra da escala: 50 μ m. (B) Micrografia eletrônica mostrando o arranjo de cloroplastos dentro as células da bainha vascular e as células do mesofilo. M - Células do mesofilo, BV - Células da bainha vascular, CL - Cloroplasto Barra da escala: 5 μ m (B).

As principais características bioquímicas e metabólicas presentes nas plantas com o metabolismo C_4 são: (1) compartimentalização da enzima fosfoenol piruvato carboxilase (PEPcase) nas células do mesofilo e da enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO) nas células da bainha vascular, e (2) produção de ácidos dicarboxílicos com quatro carbonos nas células do mesofilo (EDWARDS *et al.*, 2001b). No metabolismo C_4 , as moléculas de CO_2 provenientes das trocas gasosas realizadas através do estômato se acumulam nas cavidades subestomáticas e se difundem até as células do mesofilo, onde são convertidas a bicarbonato (HCO_3^-) pela enzima anidrase carbônica. No citoplasma das células do mesofilo, o HCO_3^- reage com o fosfoenol piruvato (PEP) e catalisado pela enzima PEPcase, produzindo ácido oxalacético

(AOA). Ainda nas células do mesofilo, o AOA pode ser metabolizado por diferentes enzimas e em diferentes locais. No caso de *Setaria viridis*, a metabolização ocorre nos cloroplastos e o AOA será convertido a malato pela NAD-malato desidrogenase. O malato é transportado para as células da bainha vascular onde será descarboxilado, originando moléculas de CO₂ e piruvato. As moléculas de CO₂ serão incorporadas ao ciclo de Calvin-Benson, enquanto que a molécula de piruvato, ao chegar aos cloroplastos das células do meristema, será fosforilada formando PEP de modo a proporcionar a continuidade do ciclo (DRINCOVICH *et al.*, 2011; HATCH, 1988).

O metabolismo C₄ pode ser dividido em três subgrupos segundo as enzimas que atuam na etapa de descarboxilação nas células da bainha vascular (Fig. 7D):

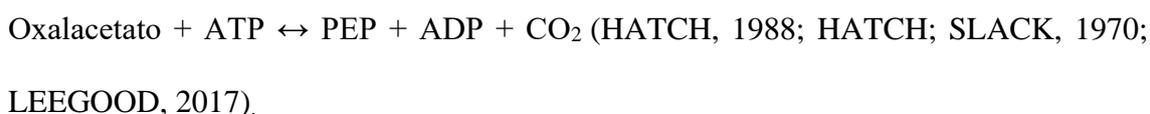
(1) Enzima málica NADP dependente (NADP-ME), atuante nos cloroplastos:



(2) Enzima málica NAD dependente (NAD-ME), atuante nas mitocôndrias:



(3) Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), atuante no citoplasma:



Além das diferentes características bioquímicas presentes em cada um dos subgrupos, também é possível identificar modificações nas características anatômicas e ultraestruturais. As variações anatômicas possíveis nos subgrupos podem ser: quantidade de camada de células BV; presença ou ausência de bainha mestomática (MS) e seu posicionamento em relação aos tecidos vasculares; e presença ou ausência de suberina nas paredes das células da BV (Fig. 7 E-G) (E. EDWARDS; VOZNESENSKAYA, 2011).

Ultraestruturalmente, as organelas podem variar no seu tamanho, número e posição dentro das células da anatomia *Kranz*. Nas células do mesofilo, as plantas C₄ apresentam número menor de cloroplastos em relação as plantas C₃. Essa redução no número de cloroplastos aumenta o acesso de CO₂ aos locais de carboxilação pela PEPcase no citoplasma das células do mesofilo (STATA *et al.*, 2014). Além disso, a disposição dos cloroplastos nas células da BV pode ser diferente entre os subgrupos. Em espécies NADP-ME, os cloroplastos da BV estão em posição centrífuga (KIM *et al.*, 1997; CUTLER, 2011; RAGHAVENDRA & SAGE, 2011). Espécies NAD-ME têm cloroplastos da BV em posição centrípeta e PEP-CK possuem cloroplastos da BV em posição centrífuga (KIM *et al.*, 1997; CUTLER, 2011; RAGHAVENDRA & SAGE, 2011). Outra característica importante está relacionada a presença de numerosos plasmodesmos entre as paredes celulares das células M e BV, o que pode aumentar a taxa de troca de metabólitos entre os dois tipos celulares (BRÄUTIGAM; WEBER, 2011).

No subgrupo NADP-ME foi observado que os cloroplastos das células do mesofilo apresentam numerosos grana, enquanto que os cloroplastos das células da bainha vascular apresentam pouca formação de grana e mais membranas tilacoides (Fig. 7 A-B) (SAGE; KHOSHRAVESH; SAGE, 2014; WISE, 2006). Nos subgrupo NAD-ME, as enzimas de descarboxilação atuam nas mitocôndrias e, devido a isso, as mitocôndrias das células da BV tendem a ser maiores, mais numerosas e próximas aos cloroplastos (SAGE; KHOSHRAVESH; SAGE, 2014).

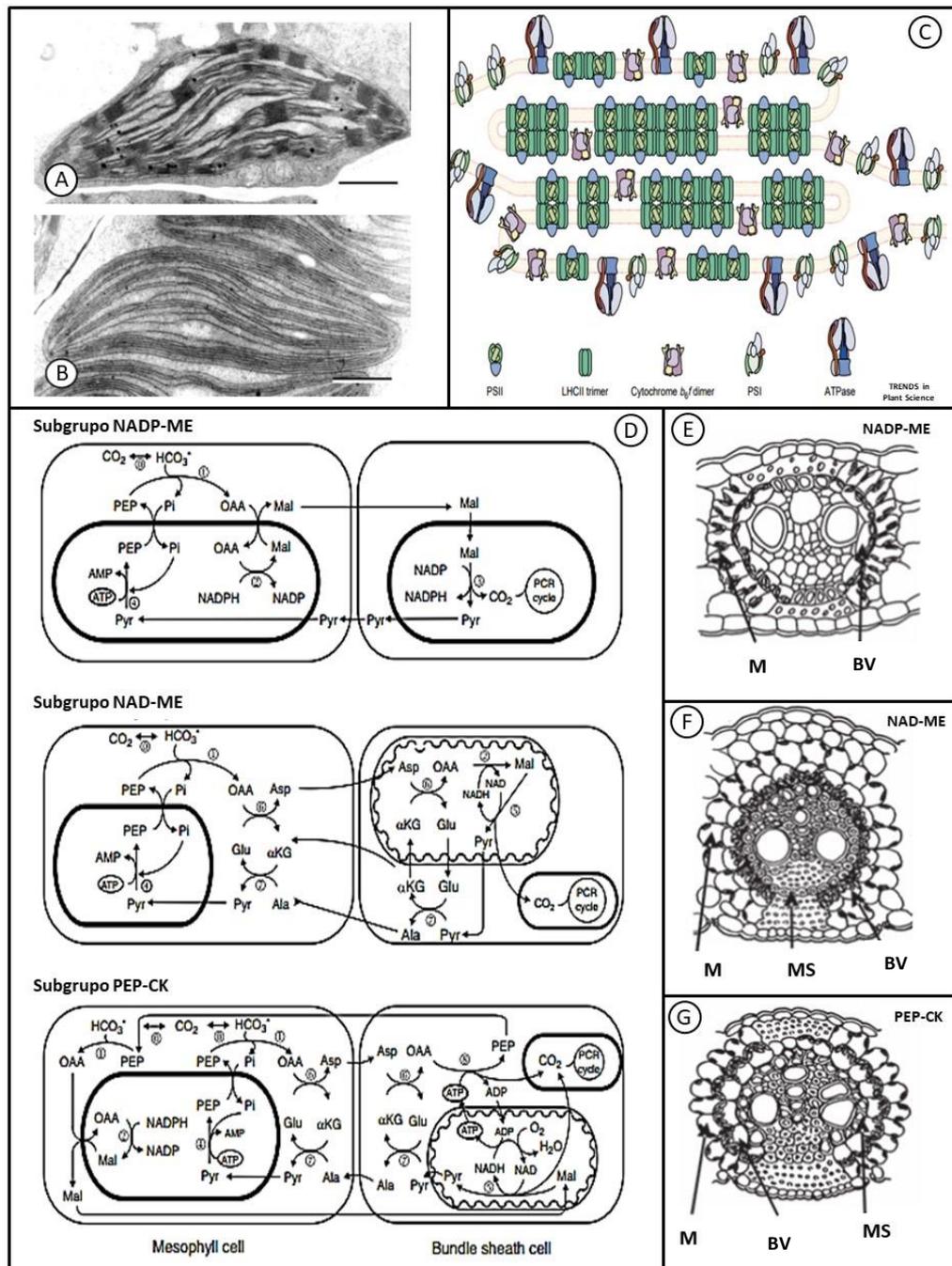


Figura 7. Variações bioquímicas, anatômicas e ultraestruturais nos subgrupos do metabolismo C₄. (A-B) Micrografia eletrônica de um cloroplasto na célula da MS apresentando grana bem desenvolvidos (A) e do cloroplasto da BS apresentando ausência de grana (B) (Milho) barra de escala = 1 μm (WISE, 2006). C) Topografia de pilhas de tilacoides e heterogeneidade lateral na distribuição de fotossistemas I e II (ALLEN; FORSBERG, 2001). (D) Etapas do metabolismo do metabolismo C₄ segundo os subgrupos NADP-ME, NAD-ME, PEP-CK (DRINCOVICH et al., 2011). (E) Anatomia Kranz em Poaceae do subgrupo NADP-ME (E. EDWARDS; VOZNESENSKAYA, 2011).

1.5.1 *Setaria viridis* (L.) Beauv: organismo modelo

A utilização de um organismo-modelo como sistema de referência é fundamental para o avanço científico e tecnológico. Estudos relacionados com a biologia vegetal estabeleceram *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh como principal modelo de estudo devido as várias características da espécie, como pequeno porte, ciclo curto e genoma pequeno (DELATORRE, 2008). Entretanto, *A. thaliana* não é capaz de abranger todas as características das famílias botânicas existentes. Para os estudos relacionados com gramíneas, arroz (*Oryza sativa*), braquipódio (*Brachypodium distachyon*) e milho (*Zea mays*) são as principais espécies utilizadas (DIAO, 2014). Contudo, as características metabólicas e fisiológicas destas espécies inviabilizam a utilização das mesmas como modelo, visto que, arroz e braquipódio apresentam metabolismo fotossintético C₃, o milho apresenta genoma complexo, plantas adultas com o porte muito elevado e ciclo de vida longo. A fim de caracterizar tanto as inovações evolutivas responsáveis pela fotossíntese C₄, quanto para fornecer informações de genômica funcional visando a melhoria de espécies, a proposição de um novo para modelo genômico fez-se necessária (BRUTNELL et al., 2010; DIAO,2014).

Nos últimos anos *Setaria viridis* tem sido proposta como modelo para estudos de plantas com o metabolismo fotossintético C₄ (BENNETZEN *et al.*, 2012; LI; BRUTNELLEt al, 2010; SEBASTIAN *et al.*, 2014; VAN ECK; SWARTWOOD, 2015). Plantas com o metabolismo fotossintético C₄, possuem grande importância econômica como o milho, sorgo e cana-de-açúcar, agregando ainda mais valor à *Setaria viridis* como modelo de estudo, visto que fazem parte do mesmo clado (Fig.8).

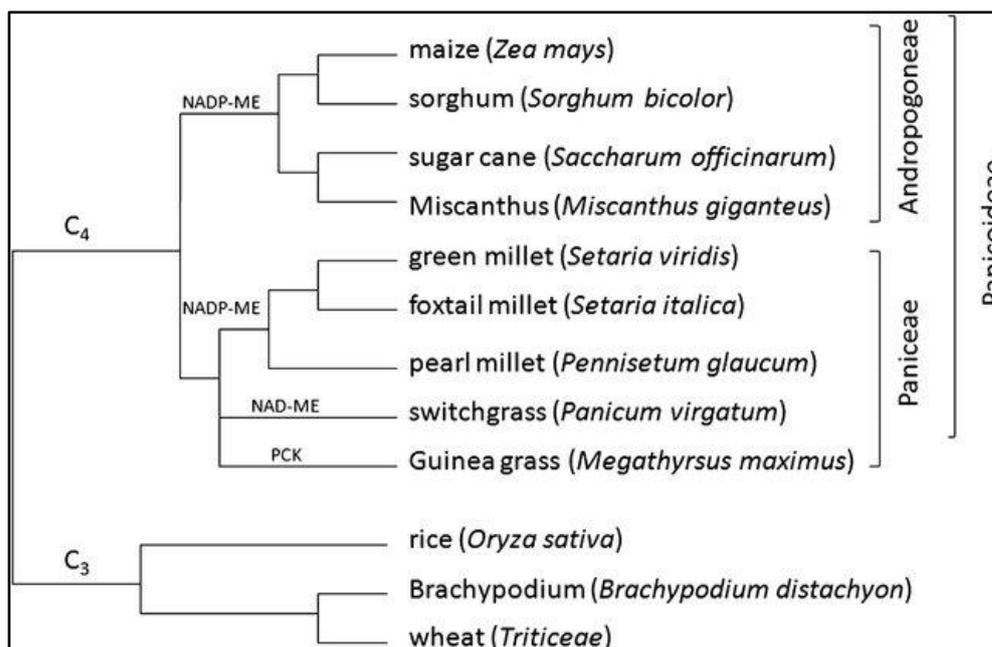


Figura 8. Filogenia da família das gramíneas. A árvore foi adaptada de Brutnell et al. (2010). *Setaria viridis*, milho e cana de açúcar são subtipo C₄ de NADP-ME que está intimamente relacionado com o *switchgrass* de matéria-prima de bioenergia (subtipo NAD-ME), *Setaria italica* e o capim-guiné (PCK). O comprimento do ramo não reflete o tempo de divergência evolutiva (Brutnell T.P et al 2010, Li & Brutnell, 2011).

O conjunto de características presentes em *Setaria viridis* são semelhantes a outros modelos de estudos comumente utilizados, tais como: genoma compacto (~510 MB), pequeno porte (30-40cm, na maturidade), ciclo de vida curto (maturação da semente, 40 dias após a germinação), compatibilidade com as metodologias de transformação por *Agrobacterium spp* (BRUTNELL et al., 2010; VAN ECK; SWARTWOOD, 2015). Em 2017 a importância de *Setaria viridis* para a comunidade científica tornou-se evidente, principalmente para as áreas de genética e genômica (DOUST; DIAO, 2017). Adicionalmente, estudos envolvendo *Setaria viridis* têm se tornado mais recorrentes considerando análises sobre os mecanismos de resistência a herbicidas (WANG et al., 2010), pesquisas com organismo modelo atrativo para estudos de biocombustíveis (BENNETZEN et al., 2012), ensaios que buscam caracterizar os diferentes tipos de acesso para estudos em fisiologia vegetal (SAHA et al., 2016) e compreensão da

ontogênese da anatomia *Kranz* (JUNQUEIRA *et al.*, 2018), assim como para a padronização de protocolos em estudos genômicos (MARTINS *et al.*, 2019).

2. Objetivos

Caracterizar os efeitos morfológicos, fisiológicos, anatômicos e ultraestruturais da aplicação dos herbicidas Paraquat, Diuron e a combinação Paraquat+Diuron em folhas de *Setaria viridis*.

2.1 Objetivos específicos

- Acompanhar as alterações morfológicas ocasionadas pelo efeito dos herbicidas em *Setaria viridis* por 24 e 96 horas;
- Avaliar o efeito dos herbicidas na atividade fotossintéticas através da fluorescência transiente;
- Mensurar e quantificar as alterações na espessura da lâmina foliar, epiderme, mesofilo;
- Observar por microscopia eletrônica de varredura as alterações morfológicas e a deposição de cera epicuticular nas células da epiderme em resposta a ação dos herbicidas;
- Analisar e quantificar as dimensões dos estômatos em decorrência do uso dos herbicidas; e
- Identificar por microscopia eletrônica de transmissão as respostas ultraestruturais após a aplicação de herbicidas.

3. Material e Métodos

3.1 Germinação

Sementes de *Setaria viridis* acesso A10.1 foram submersas em uma mistura de 1:1 de ácido giberélico (GA₃) (2,89 mM) e nitrato de potássio (KNO₃) (30 mM) em um eppendorf de 2 mL seguindo o protocolo de quebra de dormência descrito por Sebastian *et al.* (2014). Após 24h as sementes foram dispostas em placas de *petri* sob papel germitest®. O papel foi umedecido com água destilada e as sementes foram mantidas nessa condição até a expansão completa da primeira folha (6 dias após a embebição).

Em seguida, 160 plântulas foram transplantadas individualmente para vasos de 0,4L preenchidos com areia e vermiculita triturada na proporção de 19:1 (w/w, base seca) e nutridas com 0,1L de solução equivalente a solução de Hoagland número 2. As plantas foram cultivadas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h luz (intensidade de luz aproximadamente 300-400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) temperatura de 32 \pm 2°C, seguido por 8h de escuro a 24 \pm 2°C. Os vasos foram regados diariamente até a capacidade do vaso. As etapas de germinação e transplante das plântulas para os vasos foram realizados no laboratório de genética molecular vegetal (UFRJ). Ao completar 20 dias após a embebição, os vasos foram transferidos para uma casa de vegetação localizado no Instituto de Tecnologia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro onde os herbicidas foram aplicados imediatamente. A casa de vegetação apresentava fotoperíodo 14h de luz com temperatura 25,8 \pm 5,9°C, seguido por 10h de escuro a 22,5 \pm 2,4°C.

3.2 Desenho experimental e tratamentos

Neste trabalho foram utilizados dois herbicidas comerciais; Paraquat e Diuron, e um terceiro tratamento com uma mistura comercial de Paraquat com Diuron. Diferentes concentrações foram aplicadas baseadas na dose comercial. O desenho experimental foi inteiramente casualizado e foram aplicadas quatro diferentes concentrações de cada herbicida (Tabela 1) exceto no controle (sem aplicação do herbicida). Foram utilizadas cinco réplicas para cada tratamento. Após duas semanas da semeadura, plantas com crescimento homogêneo foram escolhidas e divididas nos seguintes grupos de tratamentos:

Tabela 1: Herbicidas e suas respectivas doses aplicadas em *Setaria viridis*

Nome comum	Nome Comercial	Composição do Herbicida (g ia L ⁻¹)	Doses (g ia ha ⁻¹)				Controle
			0,5D	D	1,5D	2D	
<i>Inibidores da fotossíntese</i>							
Paraquat	Gramoxone 200	200	200	400	600	800	
Diuron	Diuron Nortox 500 SC	500	1600	3200	4800	6400	Água
Paraquat+Diuron	Gramocil	200+100	200+100	400+200	600+300	800+400	

D=Dose comercial; ia=ingrediente ativo (g ia ha = grama de ingrediente ativo por hectare)

3.3 Aplicação dos herbicidas

Os herbicidas foram aplicados aproximadamente as 9h da manhã, utilizando um pulverizador costal pressurizado com CO₂ (40psi) com barra de quatro bicos de pulverização (110°/ BD015), dando um volume de suspensão de 200L ha⁻¹. No momento da aplicação a temperatura e umidade relativa eram de 23,5°C e 80%, respectivamente.

3.4 Sintomas foliares visíveis

Para a observação dos sintomas, as folhas das plantas de controle e tratamento foram fotografadas com auxílio de Câmera digital Canon (modelo EOS Rebel T6

Premium) e classificadas de acordo com a gravidade das lesões por 0 (sem lesões) a 100 (lesões severas) segundo Frans & Crowley (FRANS *et al.*, 1986). As fotografias foram classificadas de acordo com o aparecimento das alterações em: fase inicial, evidenciando o início das lesões, com a presença de sintomas leves a moderados; fase intermediária onde a planta exibe progressivo aumento do aparecimento dos sintomas, que podem ser classificados em moderados; e fase final, onde a planta apresenta sintomas graves à severos, que geralmente determinam a morte do vegetal.

3.5 Fluorescência transiente

A fluorescência transiente foi medida nos seguintes tempos: 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96 horas após a aplicação (HAA) de herbicidas usando um analisador portátil de eficiência de plantas, Handy PEA (Hansatech, Norfolk, UK). As medidas foram realizadas 20 minutos após a adaptação das folhas ao escuro. A emissão da fluorescência foi induzida com uma densidade de fluxo de fótons numa área foliar (4mm de diâmetros) exposta a um pulso de luz saturada numa intensidade de $1,500\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para a fluorescência transiente a curva de emissão foi obtida após o pulso de intensidades determinadas a $50\mu\text{s}$ (fluorescência inicial – F_0) $100, 300\mu\text{s}$, $2 (F_J)$ e $30 (F_I)\mu\text{s}$ F_M (fluorescência máxima) foram utilizados para calcular os parâmetros estabelecidos pelo teste OJIP (STRASSER *et al.*, 2004). Para realizar medidas de fluorescência foi escolhido a folha mais expandida no momento da análise.

Tabela 2. Parâmetros do teste OJIP avaliados

F_V/F_M	Rendimento quântico máximo do FSII
ABS/RC	Medida do tamanho aparente do sistema antena ou o fluxo de absorção por RC
TR_o/RC	Máxima taxa pela qual um éxciton é capturado pelo RC resultando em uma redução da plastoquinona (Q_A^-)
ET_o/RC	Reoxidação da Q_A via transporte de elétrons em um RC ativo
DI_o/RC	Razão de dissipação total de energia de excitação não capturada do total de RC, sendo a dissipação neste caso à perda de energia na forma de calor
RE_o/RC	Redução do acceptor final de elétrons no lado do acceptor de elétrons do FSI por RC
$\phi P0$	Rendimento quântico máximo fotoquímico
$\phi E0$	Rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A para o intersistema de aceptores de elétrons
$\phi D0$	Rendimento quântico para dissipação de energia
$\phi R0$	Rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A para o acceptor final de elétrons do FSI
$\psi 0$	Eficiência com que um éxciton capturado no RC pode mover um elétron de Q_A para o intersistema de aceptores de elétrons
$\rho 0$	Eficiência com que um éxciton capturado no RC pode mover um elétron dentro da cadeia de transporte de elétrons de Q_A para os aceptores finais de elétrons do FSI
$\delta R0$	Eficiência com que um elétron pode mover o intersistema de aceptores de elétrons reduzidos no intersistema para o acceptor final de elétrons do FSI
PI_{ABS}	Índice de desempenho fotossintético (conservação de energia a partir do éxciton para a redução dos aceptores de elétrons do intersistema)
$PI_{ABS, total}$	Índice de desempenho fotossintético total (conservação de energia a partir de éxciton para a redução de aceptores finais do FSI)

3.6 Microscopia

Fragmentos do terço médio da folha do quinto nó totalmente expandida foram fixados durante a noite, sob vácuo, em solução de Karnovsky (4% paraformaldeído, 2,5% glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M) após 24h e 96h da aplicação do herbicida. Após a fixação, as amostras foram lavadas 3 vezes em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1M, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% durante 2h, e novamente lavadas com tampão cacodilato de sódio por três vezes.

As amostras destinadas à análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram desidratadas em série etanólica crescente (15%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100% (3x)). As amostras foram secas pelo método do ponto crítico (K850 Critical Point Dryer, Quorum Technologies) e metalizadas com cobertura de 15 nm de ouro (Desk V Sample Preparation, Denton Vacuum). As micrografias eletrônicas foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Vega 3LMU Tescan, Brno, República Tcheca) no Núcleo de Pesquisa Multidisciplinar (NUMPEX-Bio, UFRJ) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Para análises de Microscopia Óptica (MO) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) as amostras foram desidratadas em série etanólica crescente (15%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100% (3x)), embebidas em resina hidrofílica Spurr (SPURR, 1969) e polimerizadas na estufa a 70°C por 12 horas. Após a polimerização, foram realizadas secções semifinas (1µm) transversais com facas de vidro utilizando ultramicrótopo (RMC Products, Tucson, USA). Os cortes foram corados com azul de toluidina (0,05% em água destilada) e observados por microscopia óptica de campo claro com objetivas de 20x/n0.40 e 40x/n0.65 (Leica DM 2500 Wetzlar, Germany). Após observar os cortes por microscopia óptica e definir a região de interesse, os blocos foram seccionados para microscopia eletrônica de transmissão. Foram realizadas secções

ultrafinas (60 nm) com navalha de diamante (DIATOME 45°) utilizando o ultramicrotomo (RMC Products, Tucson, USA). Os cortes foram montados em grades de cobre (300 mesh) e contrastados por imersão em solução aquosa de acetato de uranila 1% por 25 minutos e em solução de citrato de chumbo por 5 minutos, em câmara dessecante com pastilhas de hidróxido de sódio. As micrografias eletrônicas foram obtidas no Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia (INMETRO – DIMAT) utilizando o microscópio eletrônico de transmissão FEI - TECNAI SPIRIT a 80kV e no Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bi imagem (CENABIO – UFRJ) utilizando o microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 EX a 80kV.

3.7 Análises morfométricas

Nas análises morfométricas da superfície foliar foram avaliados a área, o comprimento, largura, e comprimento do ostíolo de 20 estômatos de cada tratamento. Para as análises morfométricas da anatomia foliar foram escolhidas 4 micrografias ópticas de cada tratamento. Em cada micrografia foram localizadas 10 regiões distintas e mensurados a espessura do mesofilo, face superior e inferior da epiderme. Todas as medidas foram feitas através do software ImageJ.

3.8 Análises estatísticas

Todos os dados foram analisados por ANOVA para regressões com significância de 0,05 através do software Sisvar (Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil) e as médias foram comparadas pelo teste LSD ($p \leq 0,05$).

4.Resultados

Quintuplicatas de *Setaria viridis* foram submetidas a diferentes doses dos herbicidas Paraquat e Diuron e a combinação de Paraquat+Diuron a fim de identificar as alterações morfológicas, fisiológicas, anatômicas e ultraestruturais. Análises morfológicas evidenciaram diferenças marcantes em todos os tratamentos ao longo das 96h de condução do experimento. Entretanto, para os tratamentos com os herbicidas Paraquat e Paraquat+Diuron somente foram realizadas análises até 24h. Transcorrido esse tempo, a aplicação do herbicida ocasionou necrose completa da planta.

4.1 Sintomas visíveis

4.1.1 Controle

Ao longo de todo o experimento as plantas do tratamento controle mantiveram-se com as folhas totalmente túrgidas e emitindo folhas novas sem apresentar nenhuma alteração na morfologia foliar e no seu crescimento. As únicas alterações observadas foram nas folhas que tiveram contato com o analisador portátil da fotossíntese. Resquícios de herbicida no aparelho na hora da análise pode ter ocasionado a alteração na morfologia foliar (Fig. 9A-C).

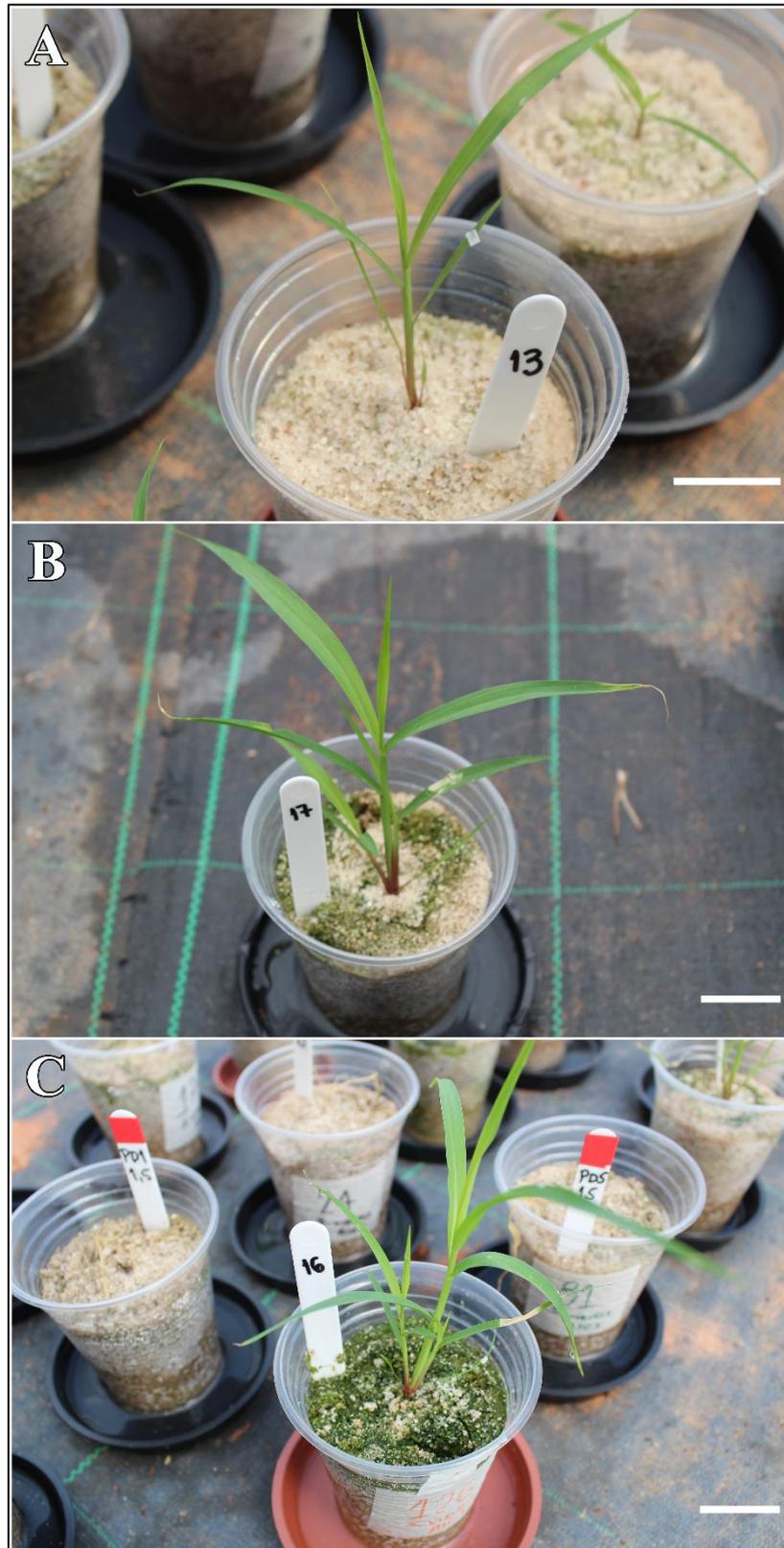


Figura 9. Morfologia das plantas controle ao longo do tempo. Tempo: (A) Fase Inicial - 24h; (B) Fase Intermediária - 96h; (C) Fase final do experimento - 163h. Barra de escala: 2,06 cm

4.1.1 Paraquat

O herbicida Paraquat provocou alteração na morfologia de plantas de *Setaria viridis*. Após a aplicação do herbicida foram observados diferentes níveis de injúrias, tais como início do processo de murchamento e clorose nas folhas em 4 HAA. Transcorridas 8h da aplicação do herbicida foram observados progressiva intensificação dos sintomas de murcha e clorose ao longo das folhas pré-existentes (Fig. 10A). Em toda a superfície analisada foi evidenciado aumento da clorose até 24h, quando foi observada a evolução das respostas com o aparecimento de necrose (Fig. 10B). Em 48 HAA as plantas estavam completamente secas e necrosadas (Fig.10C). Análises comparativas evidenciaram que ao longo de todo o tempo observado as plantas apresentavam menor altura em comparação ao controle (Fig. 9A-C). Esses sintomas foram os mesmos observados em todas as doses.

Ao avaliar as injúrias causadas após a aplicação do herbicida, ficou evidente que 4 HAA diferentes doses do herbicida exibiram sintomas severos para todas as concentrações testadas, com progressão para sintomas muito severos em 24 HAA. Ressalta-se que em 48 HAA todas as plantas estavam mortas (Tabela 3).



Figura 10. Efeito do herbicida Paraquat na morfologia das plantas ao longo do tempo. (A) Fase Inicial - 8h; (B) Fase Intermediária - 24h; (C) Fase final - 48h. Barra de escala: 2,06cm. Legenda: Murchamento (▲); Clorose (★); Necrose (●)

4.1.2 Diuron

Alterações morfológicas similares foram observadas em plantas de *Setaria viridis* em decorrência da aplicação do herbicida Diuron, no entanto o aparecimento das respostas foi mais lento quando comparado com as alterações descritas para o herbicida Paraquat. Os sintomas são classificados como muito leves ou leves e somente pontos isolados de clorose foram exibidos após 4 HAA. Sintomas característicos de clorose foram evidenciados em 8 HAA. Transcorridas 24h da aplicação, os sintomas progrediram sendo classificados como intermediários a partir da dose comercial, quando foram observados aumento dos pontos de clorose na superfície foliar seguido de murcha, principalmente em concentrações maiores do que a dose comercial (Fig. 11A). Entretanto, as plantas exibiam características morfofisiológicas preservadas e os pontos de clorose poderiam ter relação com as gotas proveniente da pulverização do herbicida. Conforme relatado para o Paraquat, após 72 HAA lesões muito severas foram exibidas nas folhas de *Setaria viridis* submetidas ao tratamento com Diuron (Tabela 3), evidenciadas pela presença de folhas pré-existentes murchas e necrose para todas as doses avaliadas (Fig. 11B). Observou-se em 96 HAA que as manchas acastanhadas do processo de necrose apresentavam comportamento basípeto nas folhas (Fig. 11C). Não houve emergência de novas folhas após a aplicação do herbicida.

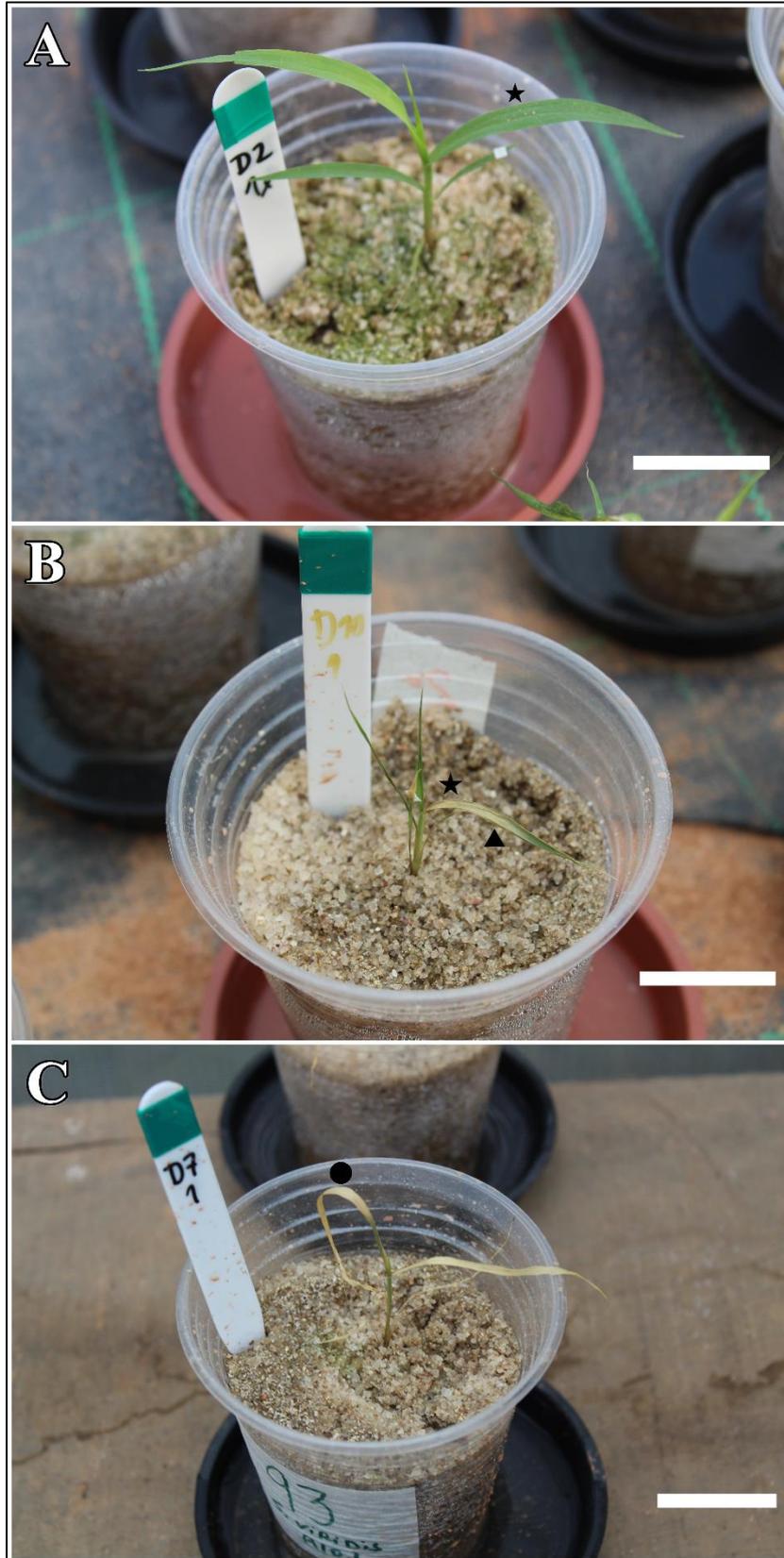


Figura 11. Efeito do herbicida Diuron na morfologia das plantas ao longo do tempo. (A) Fase Inicial - 24h; (B) Fase Intermediária - 72h; (C) Fase final - 96h. Barra de escala: 2,06cm. Legenda: Murchamento (▲); Clorose (★); Necrose (●)

4.1.3 Paraquat+Diuron

Os sintomas observados nas folhas das plantas tratadas com Paraquat+Diuron foram os mesmos mostrados acima para o herbicida Paraquat. Em 8 HAA as folhas apresentavam pontos de clorose e murcha (Fig. 12A). Transcorridas 24h da aplicação todas os exemplares revelavam folhas com sinais de necrose e com despigmentação foliar (Fig. 12B). As plantas estavam completamente secas e necrosada sem 48 HAA (Fig. 12C). Todas as concentrações testadas exibiram lesões severas após 4h da exposição ao herbicida, progredindo para lesões muito severas em 24h. Em 48 HAA as plantas estavam mortas (Tabela 3).

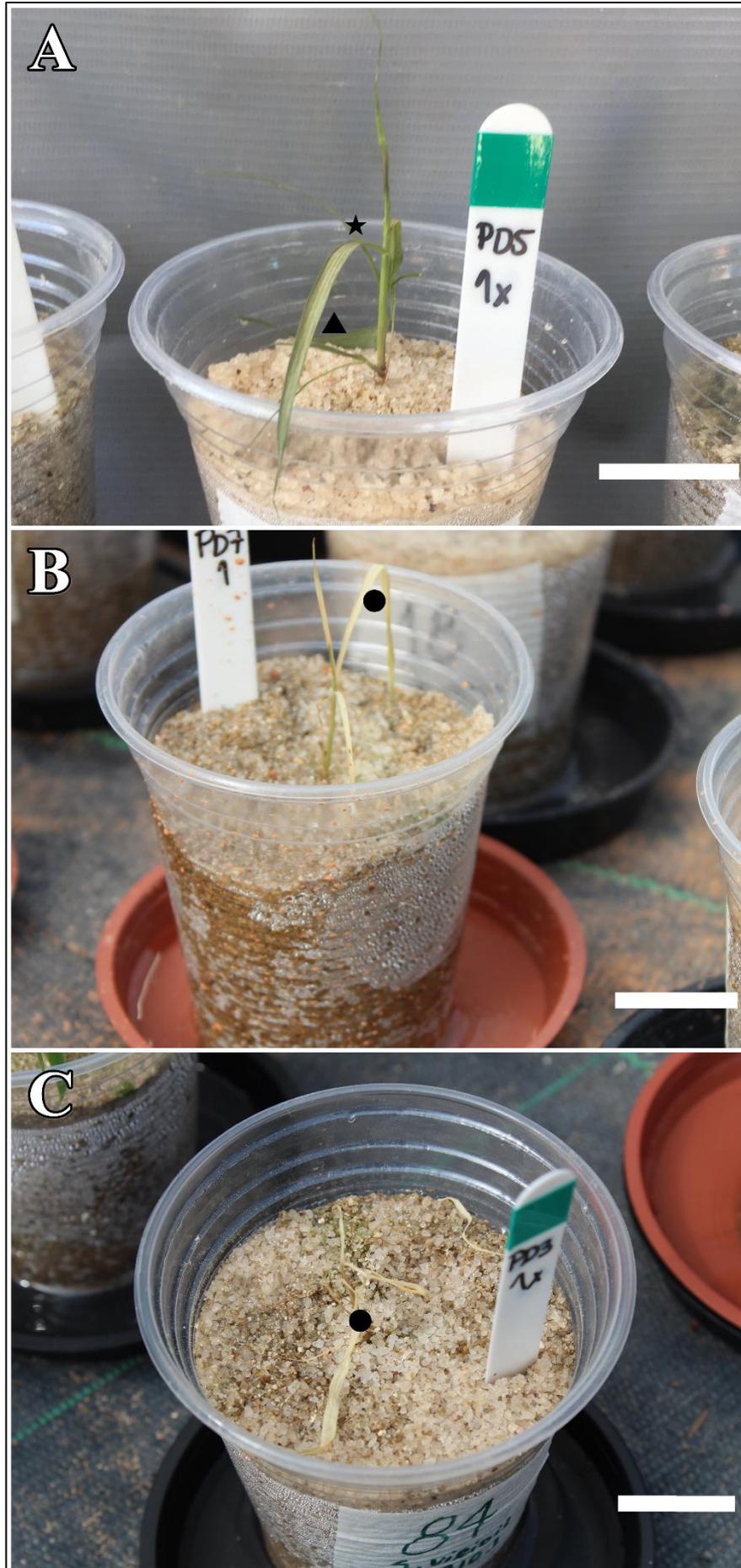


Figura 12. Efeito do herbicida Paraquat+Diuron na morfologia das plantas ao longo do tempo. (A) Fase Inicial - 8h; (B) Fase Intermediária - 24h; (C) Fase final - 48h. Barra de escala: 2,06cm. Legenda: Murchamento (▲); Clorose (★); Necrose (●)

Tabela 3. Avaliação de injúrias visuais em *Setaria viridis* após a aplicação dos herbicidas Paraquat, Diuron, Paraquat+Diuron

Herbicida	Dose (g ia ha ⁻¹)	Lesões Visuais (%)				
		Tempo após a aplicação				
		4h	24h	48h	72h	96h
Paraquat	200	S ²	S ³	X	-	-
	400	S ²	S ³	X	-	-
	600	S ³	S ³	X	-	-
	800	S ³	S ³	X	-	-
Diuron	1600	L ⁴	L ⁴	M ⁵	M ⁵	S ³
	3200	L ⁴	M ⁵	S ⁴	S ⁴	S ³
	4800	L ⁴	M ⁵	S ⁴	S ⁴	S ³
	6400	L ⁴	M ⁵	S ⁴	S ⁴	S ³
Paraquat+ Diuron	200+100	S ²	S ³	X	-	-
	400+200	S ²	S ³	X	-	-
	600+300	S ²	S ³	X	-	-
	800+400	S ²	S ³	X	-	-

As lesões foram estimadas visualmente usando as seguintes intensidades: Leve (L) 0 – 33%; Moderado (M) 34 – 66%; Severo (S) 67 – 100% (X) Morte das plantas; As porcentagens das lesões seguem os parâmetros de Frans & Crowler (FRANS *et al.*, 1986); (1) Pontos de necrose no tecido foliar; (2) murchamento e pontos de necrose; (3) necrose por completo no tecido foliar; (4) pontos de clorose tecido foliar ; (5) murchamento e pontos de clorose.

4.2 Fluorescência transiente da clorofila *a*

4.2.1 Paraquat

Após realizar a aplicação de diferentes doses de herbicidas, foi realizado a análise do rendimento o rendimento quântico máximo do FSII nos tempos de 2, 4, 8 e 24 HAA. O efeito das diferentes doses empregadas (200, 400, 600 e 800 g ia ha⁻¹) no rendimento

quântico do FSII foi similar. Em apenas 2 horas, o herbicida causou redução no parâmetro ($F_V/F_M < 0,2$) para todas as doses aplicadas. Foi observado que a menor dose aplicada (200 g ia ha^{-1}) foi suficiente para causar danos efetivos na atividade fotossintética. A ação do herbicida impossibilitou mensurar a atividade fotossintética nos tempos de 8h e 24h para todas as doses ($F_V/F_M < 0,1$), (Fig. 13).

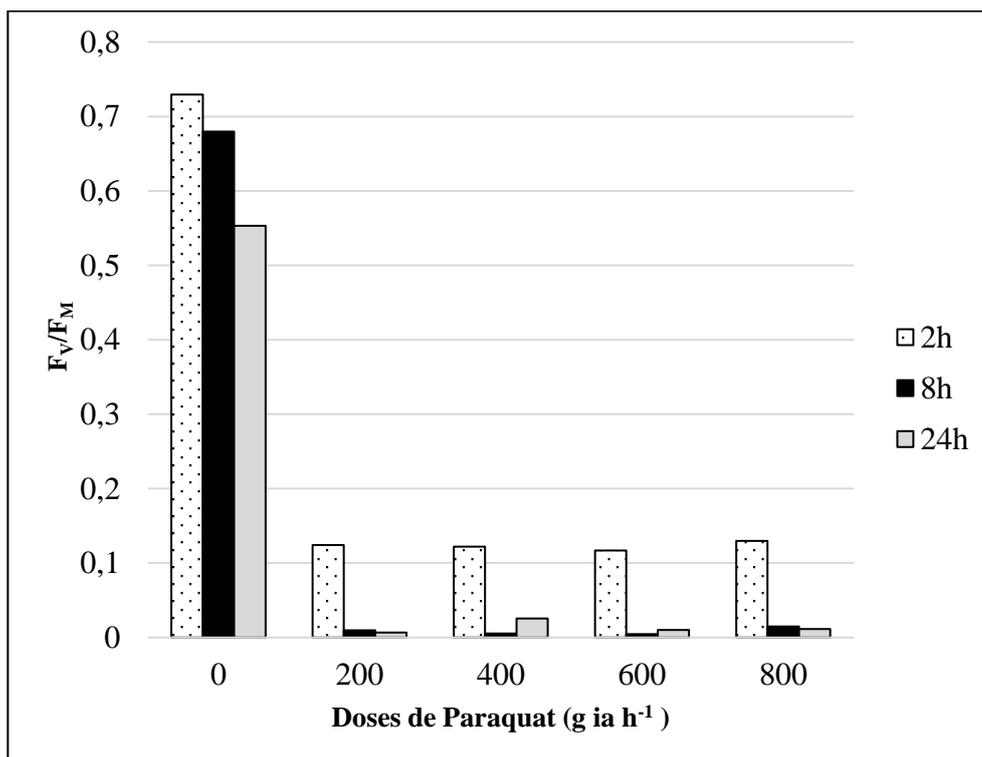


Figura 13 Rendimento quântico máximo do FSII, F_V/F_M da folha de *Setaria viridis* tratadas com diferentes doses de Paraquat. (0) – Controle. O rendimento declinou drasticamente após 2 HAA. Nos tempos 8 e 24 HAA $F_V/F_M < 0,1$.

4.2.3 Diuron

O herbicida Diuron causou redução ao longo do tempo no rendimento máximo do FSII – F_V/F_M . Após a aplicação do herbicida, o rendimento quântico declinou 2 HAA. Em 8 HAA foi observado $F_V/F_M (> 0,1)$ nas doses de 1600 a 4800 (g ia h^{-1}). Enquanto no tratamento com a dose de 6400 (g ia h^{-1}) houve a redução do $F_V/F_M (< 0,1)$ após 2HAA.

Em 24 HAA, as plantas tratadas com herbicida Diuron exibiram baixa ou nenhuma atividade fotossintética $F_v/F_M (\leq 0,1)$ para todas as doses (Fig.14).

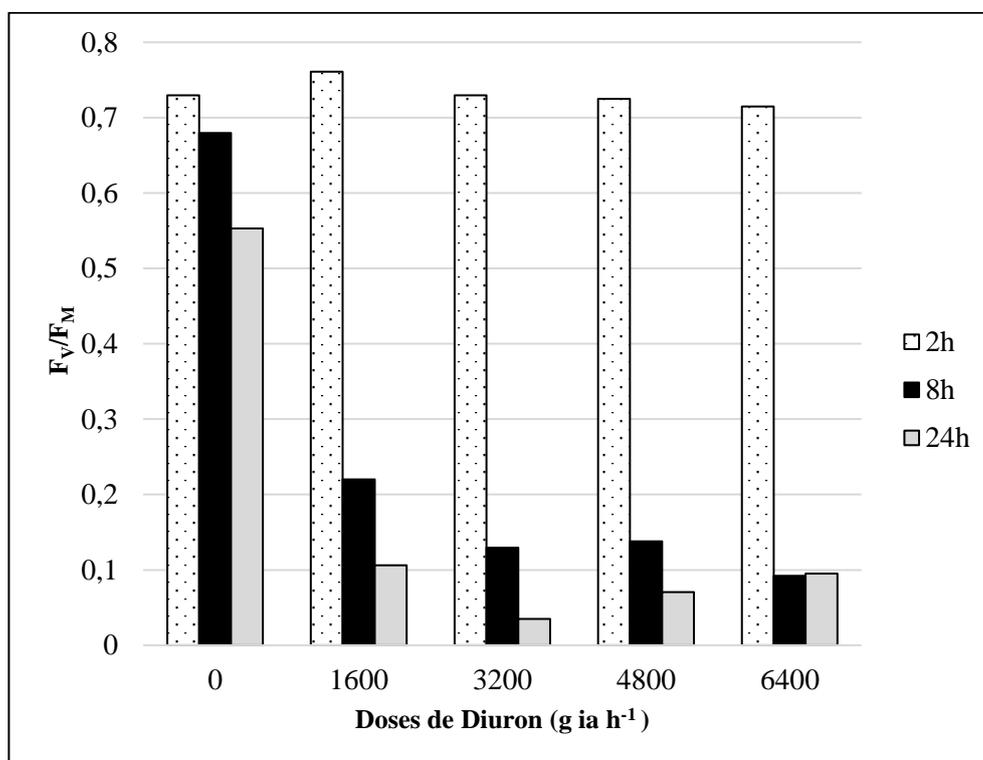


Figura 14. Rendimento quântico máximo do FSII, F_v/F_M de *Setaria viridis* tratadas com diferentes doses de Diuron. (0) – Controle. O rendimento declinou após 2 HAA. Entre 4 e 8 HAA o $F_v/F_M (> 0,1)$ nas doses de 1600 a 4800 (g ia h⁻¹). Na dose de 6400(g ia h⁻¹) $F_v/F_M (> 0,1)$ apenas as 4 HAA. As 24 HAA o $F_v/F_M (\leq 0,1)$ para todas as doses.

Entre as doses crescentes de Diuron utilizadas não foi observado mudanças significativas na fluorescência da clorofila. Em 4 HAA, o fluxo de energia retido (TR_0/RC) diminuiu para as plantas tratadas. Isso indica lesão na redução de Q_A . Diuron afetou o rendimento quântico do transporte de elétrons de Q_A^- para a acceptor final de elétrons do FSI (ϕRo). Diminuiu a eficiência com que os elétrons se movem do intersistema de acceptor de elétrons reduzidos para o acceptor final de elétrons do FSI(δRo). Assim, o fluxo de transporte de elétrons por centro de reação (ET_0/RC) foi drasticamente reduzido (próximo de 0) a partir de 4HAA e em todas a doses utilizadas (Fig.15A).

Em 8 HAA, o ET_0/RC continuou a declinar e o transporte de elétrons de Q_A para o interceptor do aceptor de elétrons (ϕE_o) também foi comprometido. Assim, o índice de desempenho fotossintético (PI_{ABS}) diminuiu e apresentou redução ao longo do tempo. Observou-se ainda um aumento nos índices específicos por centro de reação (RC), ABS/RC (medida do tamanho aparente do sistema antena ou fluxo de absorção por RC) e DIo/RC (razão de dissipação de energia de excitação não capturada do total de RC) (Fig. 15B).

Em 24 HAA, os PI_{ABS} foram prejudicados ocasionando a diminuição do rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A para o intersistema de aceptores de elétrons (ϕE_o) e os índices ABS/RC e DIo/RC encontravam-se ainda mais altos. A cadeia de transporte de elétrons também foi completamente paralisada sob essas condições (Fig. 15C).

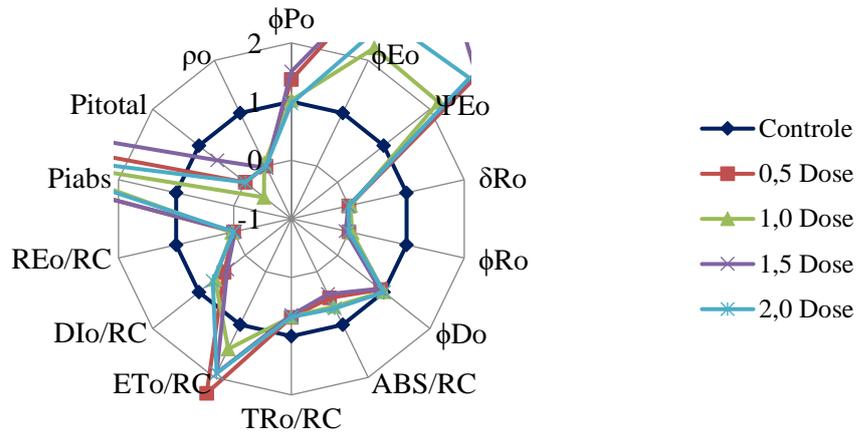
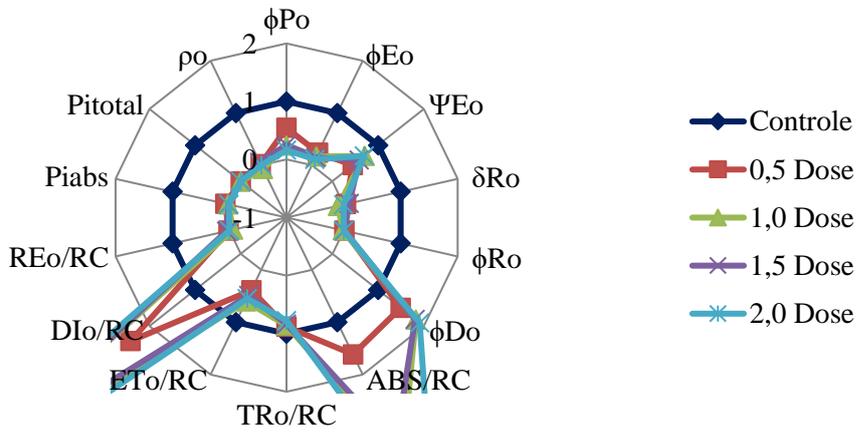
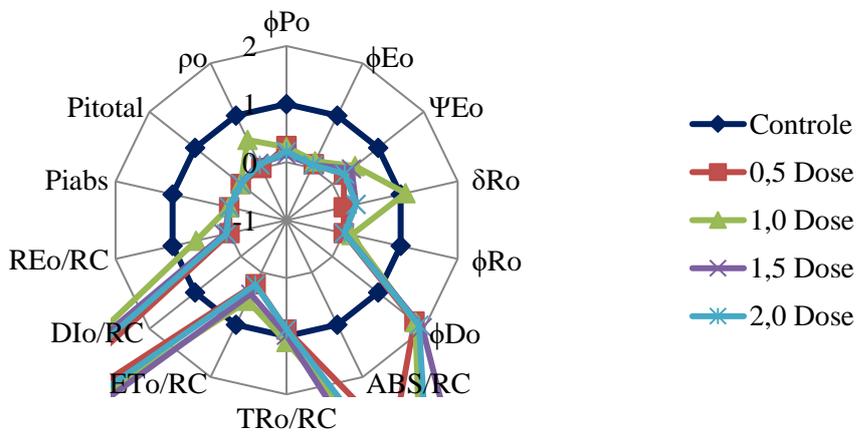
A**B****C**

Figura 15. Efeito de diferentes doses de Diuron na fluorescência transitente. Alguns parâmetros do Teste OJIP obtidos em folhas de *Setaria viridis* (A) 4 HAA; (B) 8 HAA; (C) 24 HAA. Os dados foram comparados em relação aos valores do tratamento controle (valor transformado para 1).

4.2.4 Paraquat+Diuron

O tratamento com Paraquat+Diuron causou um dano similar ao observado no tratamento somente com Paraquat. A menor dose (200+100 g ia h⁻¹) foi suficiente para reduzir a atividade fotossintética F_v/F_M ($< 0,4$). A mesma redução foi observada para a dose 400+200 g ia h⁻¹. Embora tenha ocorrido uma diminuição na atividade fotossintética, em 2 HAA o rendimento quântico máximo do FSII foi superior ao observado no tratamento somente com Paraquat ($F_v/F_M < 0,2$) para todas as doses testadas (Figs.13 e 16). Ainda em 2 HAA foi observado que nos tratamentos com as doses 600+300 e 800+400 g ia h⁻¹ a atividade fotossintética foi superior às menores doses de Paraquat? ($F_v/F_M \geq 0,4$). Entretanto, em 8HAA as plantas no tratamento com a combinação de herbicidas não apresentavam mais atividade fotossintética mensurável ($F_v/F_M < 0,1$) (Fig.16).

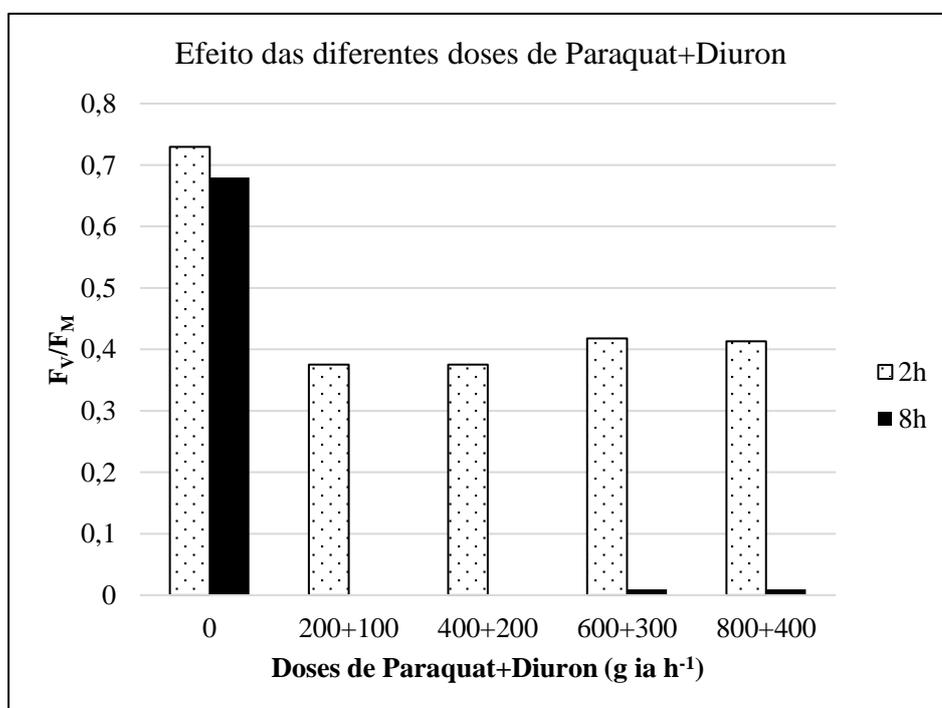


Figura 16. Rendimento quântico máximo do FSII, F_v/F_M de *Setaria viridis* tratadas com diferentes doses de Paraquat+Diuron. (0) – Controle. O rendimento declinou drasticamente após 2 HAA. Nos tempos 4, 8 e 24 HAA F_v/F_M ($< 0,1$).

4.3 Superfície

4.3.1 Controle

Fragmentos do terço médio da folha do quinto nó de *Setaria viridis* observadas em microscopia eletrônica de varredura evidenciaram que a face adaxial se apresenta dividida em regiões costais e intercostais, exibindo células longas dispostas em fileiras, além de estômatos e tricomas diversos (Fig. 17A). Na face adaxial da epiderme, a região costal apresenta um padrão de células epidérmicas retangulares com aspecto túrgido (Fig. 18A) além de tricomas tectores unisseriados e unicelulares com paredes espessas em forma de gancho dispersos em fileiras. Nessas regiões também são observados aleatoriamente a presença de tricomas bicelulares. Tricomas tectores unicelulares com paredes espessas e extremidades afiladas, em forma de espinho, estão distribuídos somente na região intercostal da face adaxial da epiderme (Fig. 17A). Entre os tricomas, na região intercostal estão localizados fitólitos com morfologia bilobar (Fig. 19B-23A).

As folhas são anfiestomáticas, com estômatos mostrando células guarda em formato halteriforme margeadas pela célula subsidiária em formato arredondado. Os estômatos são distribuídos linearmente nas regiões costal e intercostal das folhas (Fig. 20A-24A). Após 24 h do início do experimento os fragmentos foliares exibiam células subsidiárias com aparência túrgida, estômatos com área média de $291 \mu\text{m}^2 (\pm 56,8)$, evidenciando $20 \mu\text{m} (\pm 2,2)$ de comprimento, $16 \mu\text{m} (\pm 2,3)$ de largura e comprimento médio do ostíolo de $14 \mu\text{m} (\pm 1,9)$ (Figs. 25-26). Em 96 h horas foram observados estômatos com área média de $345 \mu\text{m}^2 (\pm 73,2)$, $21 \mu\text{m} (\pm 2,3)$ de comprimento, $20 \mu\text{m}$ de largura ($\pm 3,0$) e $12 \mu\text{m} (\pm 2,5)$ de comprimento do ostíolo com células subsidiárias com aparência túrgidas (Figs. 27-28). Todas as células epidérmicas são cobertas com uma

alta densidade de cera epicuticular, com padrão cristalóide e intensas vilosidades sobre as células estomáticas (Figs. 20A-24A).

4.3.2 Paraquat

A aplicação do herbicida ocasionou alterações anatômicas após 24h do início do experimento. Observou-se enrugamento das células epidérmicas da região costal e intercostal, o que ocasionou perda do formato retangular característico e alteração da orientação da região costal tornando-a sinuosa (Figs.17B-18B). Paraquat degradou a superfície foliar evidenciando a presença dos fitólitos na região intercostal (Fig. 19B). O complexo estomático exibiu alteração evidenciada pela perda do formato halteriforme das células-guarda e morfologia mais afilada, assim como células subsidiárias menos arredondadas (Fig. 20B). Foi observada compressão do volume das células estomáticas na face adaxial da epiderme (Fig. 17F). Substancial redução do lúmen celular foi observada em resposta a ação do herbicida evidenciada principalmente pela desorganização celular e decréscimo na área dos estômatos, que passaram a exibir área média de $177 \mu\text{m}^2 (\pm 36,7)$ (Fig. 25). Evidenciou-se decréscimo na largura dos estômatos, que passaram a apresentar valor médio de $10 \mu\text{m} (\pm 1,7)$, enquanto o comprimento ($19 \mu\text{m} \pm 2,6$) e o tamanho do ostíolo ($12 \mu\text{m} \pm 2,5$) não sofreram alterações significativas (Fig. 26). Apesar das alterações na superfície foliar, nenhum dos tricomas presente na superfície foliar sofreu alteração morfológica em comparação ao controle, a densidade e o formato cristalóide da cera epicuticular se manteve preservada (Fig. 20B).

4.3.3 Diuron

No tratamento com Diuron, em 24 HAA a região costal manteve sua disposição paralela e linear semelhante ao observado no controle (Fig. 17C), entretanto as células epidérmicas da região costal e intercostal estavam enrugadas, perdendo sua forma retangular característica (Figs.18C). O herbicida ocasionou degradação na face adaxial

da epiderme sendo capaz de evidenciar a presença dos fitólitos com morfologia bilobada sob as células epidérmicas da região costal (Fig. 19B). Apesar da ocorrência de alteração no formato característico dos estômatos, tais modificações não foram evidenciadas por mudanças nas dimensões (Fig. 20C). A área média dos estômatos foi de $248 \mu\text{m}^2 (\pm 41,6)$, mostrando $19 \mu\text{m} (\pm 1,6)$ de comprimento, $15 \mu\text{m} (\pm 2,5)$ de largura e $14 \mu\text{m} (\pm 1,5)$ de comprimento do ostíolo (Figs. 25-26). Nas análises realizadas em 96 HAA na face adaxial da epiderme, ambas as regiões, costal e intercostal, progrediram para um estágio de perda da cutícula e degradação da parede celular ocasionando a destruição da superfície das células (Figs. 21B-22B). Como principal consequência desse processo a presença dos fitólitos e o lúmen das células do mesofilo tornou-se mais evidente (Fig. 23B). As células guardas, subsidiária tornaram-se achatadas e retraídas causando uma diminuição das dimensões dos estômatos assim como uma alteração no posicionamento (Fig. 24B). Tais alterações resultaram na redução significativa da área estomática e da largura dos estômatos, apresentando dimensões de $199 \mu\text{m}^2 (\pm 34,1)$ e $12 \mu\text{m} (\pm 3,3)$, respectivamente (Figs. 27-28). O comprimento do estômato ($19 \mu\text{m} \pm 2,0$) e do ostíolo ($11 \mu\text{m} \pm 1,5$) não sofreram alterações significativas. Apesar das alterações na face adaxial da epiderme a densidade e o formato da cera epicuticular mantiveram o padrão observado no controle (Fig. 24B).

4.3.4 Paraquat+Diuron

As plantas que foram submetidas à combinação dos herbicidas apresentaram murchamento nas células epidérmicas da região costal e intercostal, entretanto, o arranjo paralelo das células epidérmicas e padrão retangular característico foi preservado (Fig. 17D-18D). Além disso, a presença dos fitólitos entre os tricomas na região costal foi exibida, evidenciado pela alteração na parede externa da face adaxial das células da

epiderme (Fig. 19D). As células subsidiárias e as células guardas tiveram sua morfologia alterada, ocasionando redução do estômato (Fig. 20D). Apesar das alterações morfológicas, a redução do estômato não foi significativa em comparação ao controle. Os estômatos apresentaram área média de $206 \mu\text{m}^2 (\pm 38,5)$, $18 \mu\text{m} (\pm 1,4)$ de comprimento, $12 \mu\text{m} (\pm 3,1)$ de largura e $11 \mu\text{m} (\pm 1,8)$ de ostíolo após a aplicação do herbicida (Figs. 25-26). A densidade e o padrão cristalóide da cera epicuticular não sofreu alteração e se manteve semelhante ao observado no controle (Fig. 20D).

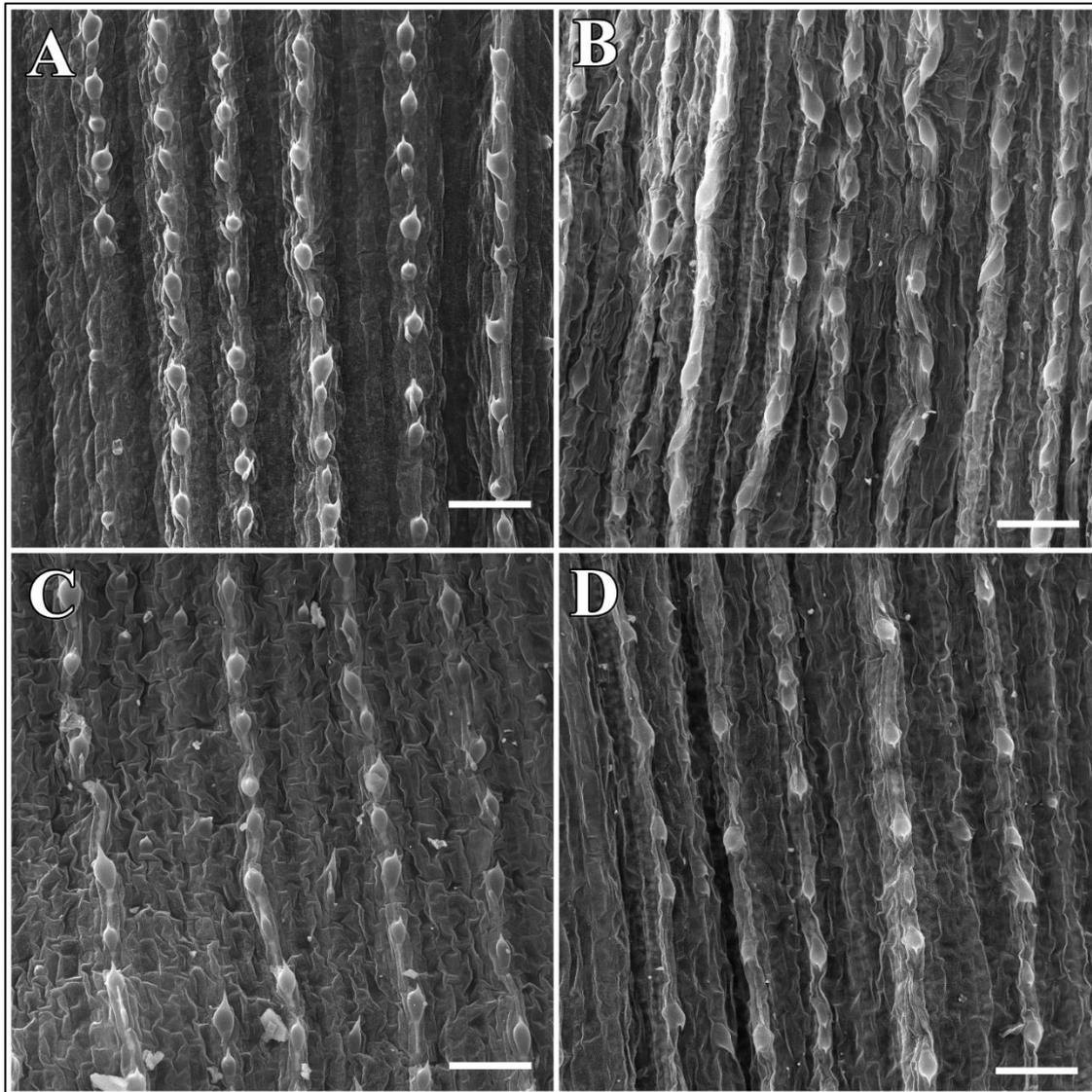


Figura 2. Efeito dos herbicidas na superfície foliar de *Setaria viridis* 24 HAA. Presença de região costal e intercostal dispostas linearmente e paralelamente (A, C, D) Região costal sinuosa e paralela (B). Controle (A); Paraquat (B), Diuron (C); Paraquat+Diuron (D). Barra de escala 50 µm.

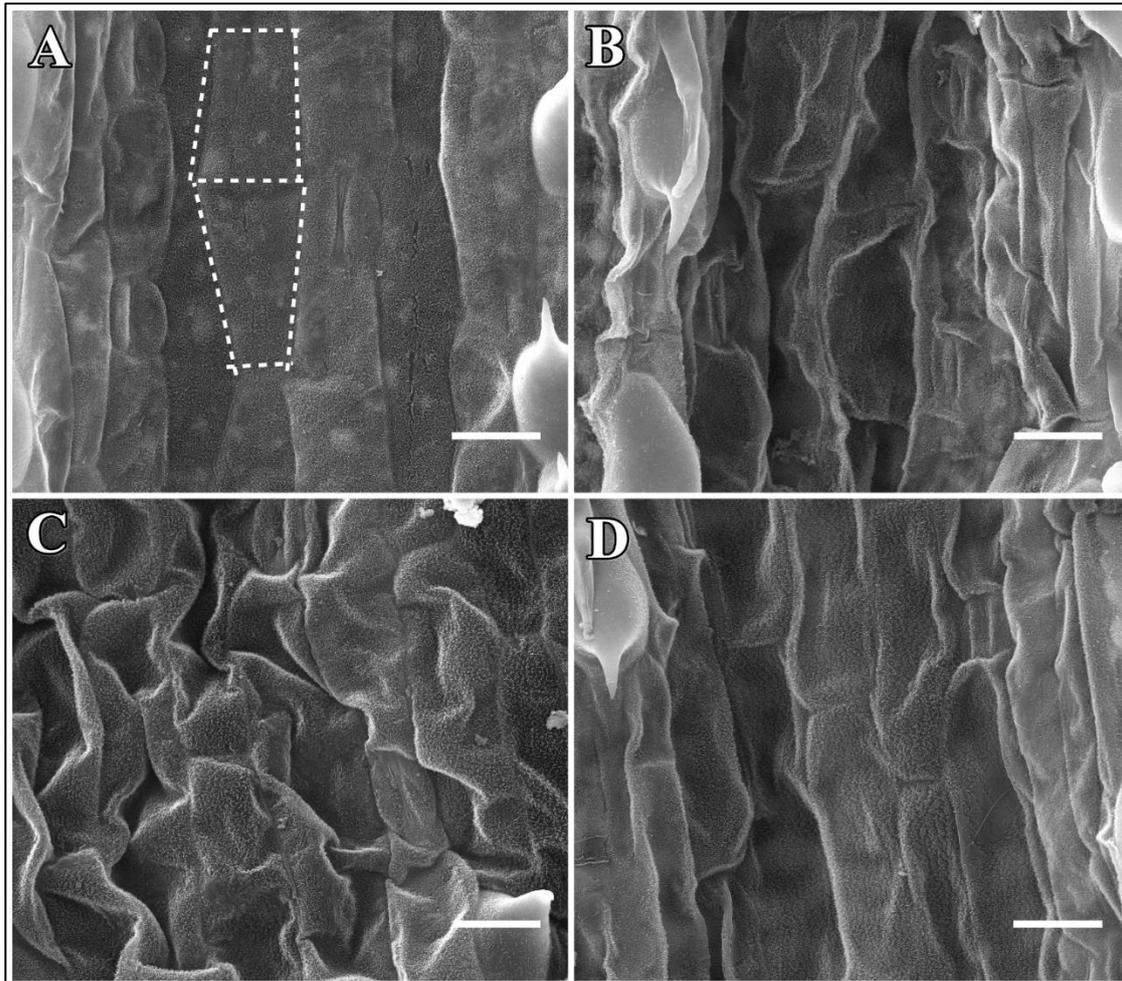


Figura 3. Efeito dos herbicidas nas células epidérmicas de *Setaria viridis* 24 HAA. Região costal evidenciando a presença de tricomas e padrão retangular das células epidérmicas (A-D). Epiderme das plantas controle, retangulares e túrgidas (A). Paraquat causou o murchamento das células epidérmicas (B). Diuron causou enrugamento das células epidérmicas (C). Paraquat+Diuron ocasionou murchamento, mas o padrão retangular manteve -se (D). Barra de escala 20 μm .

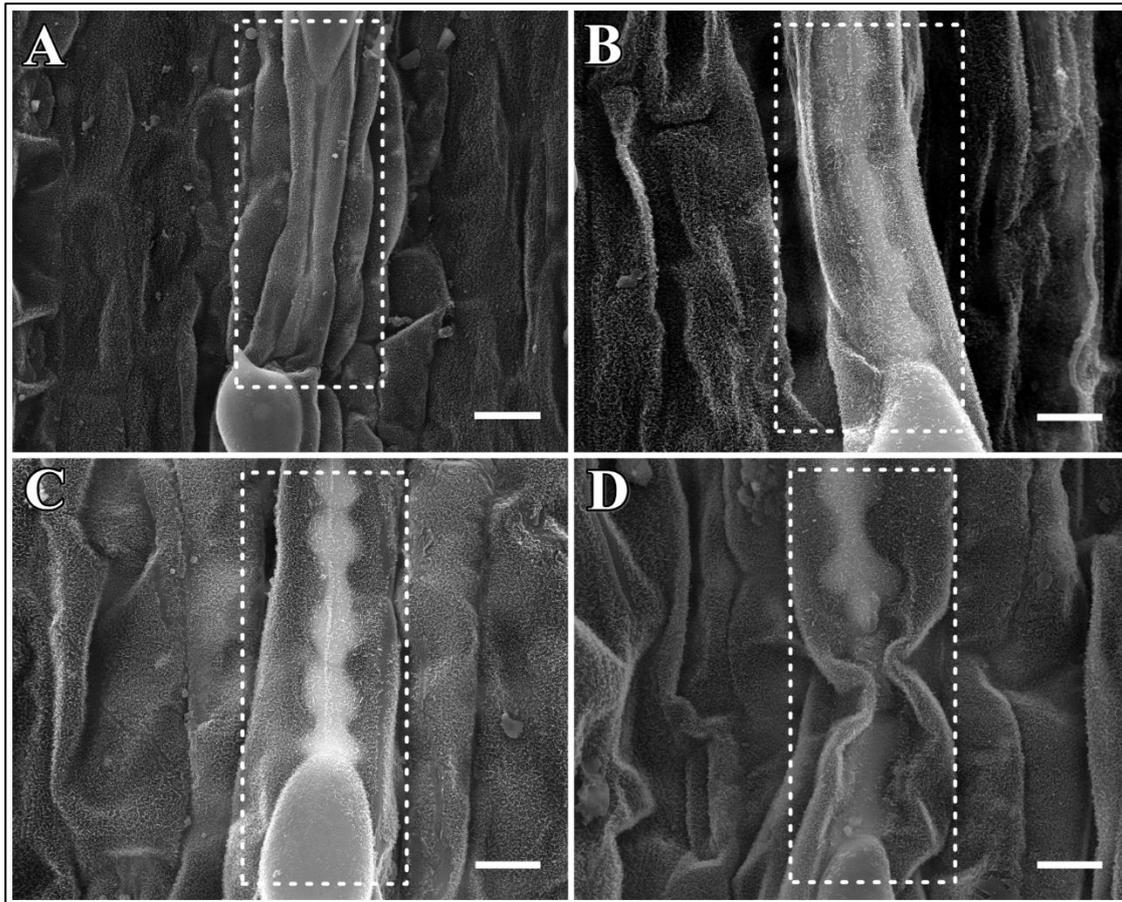


Figura 19. Efeito dos herbicidas na superfície foliar de *Setaria viridis* 24 HAA. Herbicidas ocasionaram degradação na superfície foliar evidenciando a presença dos fitólitos (B-D). Controle (A); Paraquat (B); Diuron(C); Paraquat+Diuron (D). Barra de escala 10 µm (B, C, D); 20 µm (A)

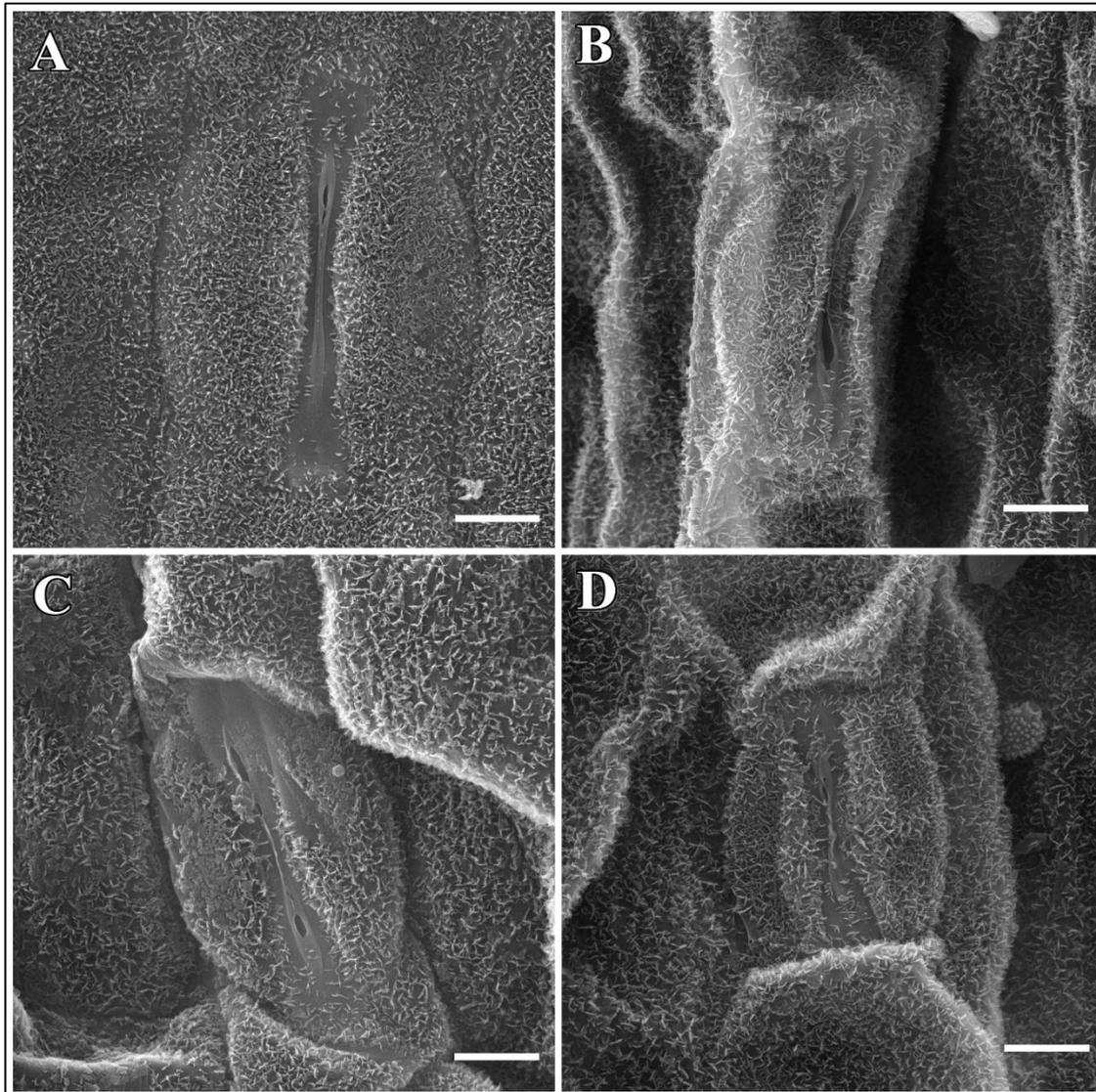


Figura 20. Efeito dos herbicidas nos estômatos de *Setaria viridis* 24 HAA. Estômato composto por células guardas halteriformes e células subsidiárias (A-D) Os herbicidas ocasionaram alterações na morfologia dos estômatos. Controle (A); Paraquat (B); Diuron (C); Paraquat+Diuron (D). Barra de escala 5 µm.

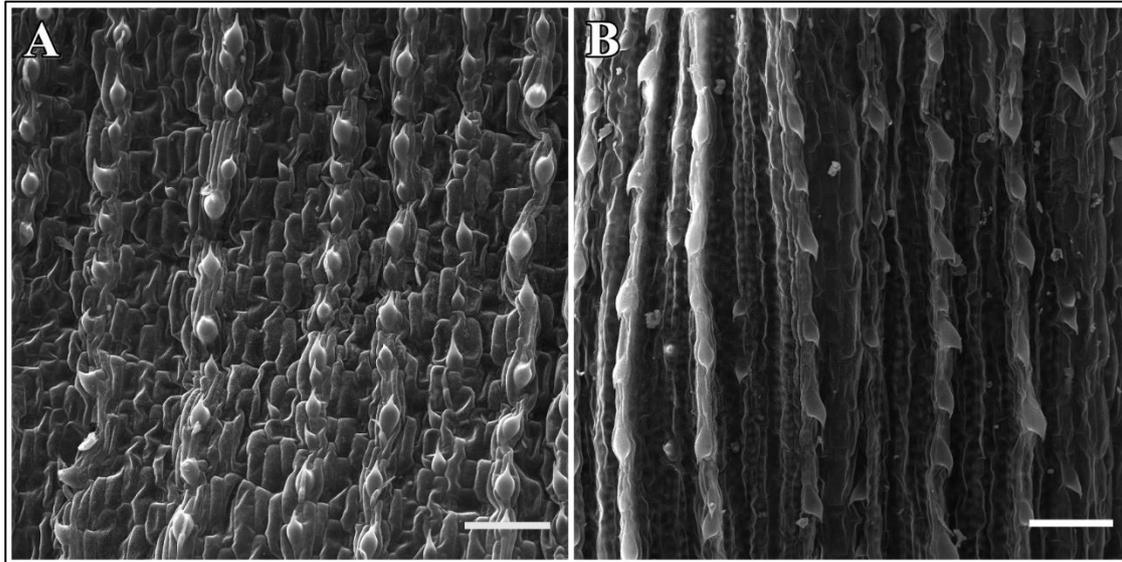


Figura 21. Efeito dos herbicidas na superfície foliar de *Setaria viridis* 96 HAA. Presença de região costal e intercostal dispostas linearmente e paralelamente (A) Região costal sinuosa e paralela (B). Controle (A); Diuron (B). Barra de escala 50 µm.

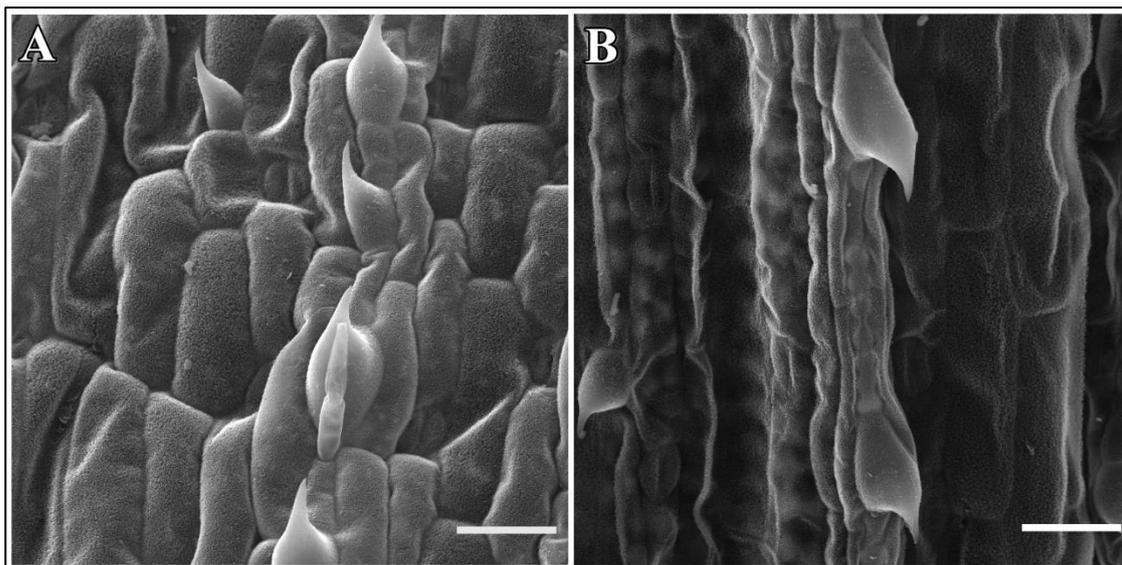


Figura 22. Efeito dos herbicidas nas células epidérmicas de *Setaria viridis* 96 HAA. Região costal evidenciando a presença de tricomas e padrão retangular das células epidérmicas (A). Epiderme das plantas controle, retangulares e túrgidas (A). Diuron causou o murchamento das células epidérmicas (B). Barra de escala 30 µm.

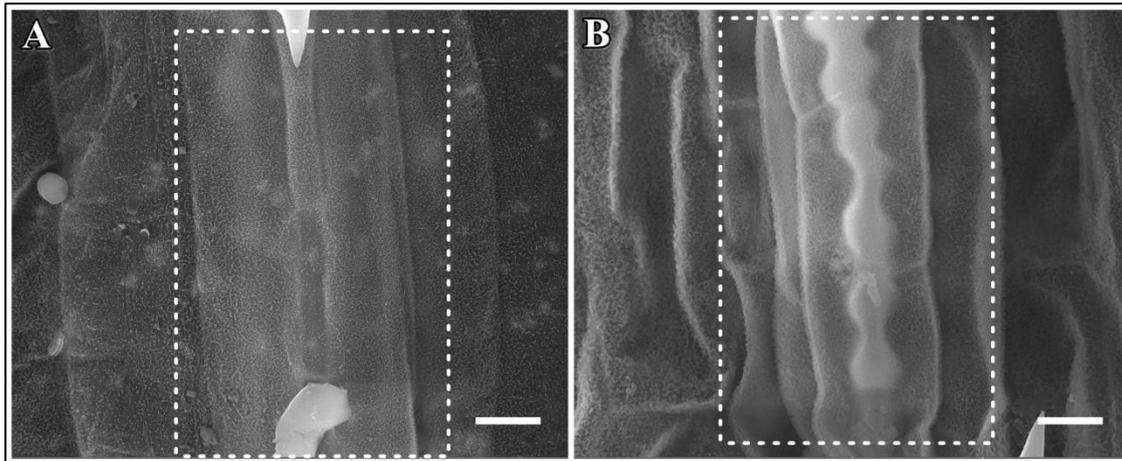


Figura 23. Efeito dos herbicidas na superfície foliar de *Setaria viridis* 96 HAA. Diuron ocasionou degradação na superfície foliar evidenciando a presença dos fitólitos (B). Controle (A); Diuron (B). Barra de escala 10 μm .

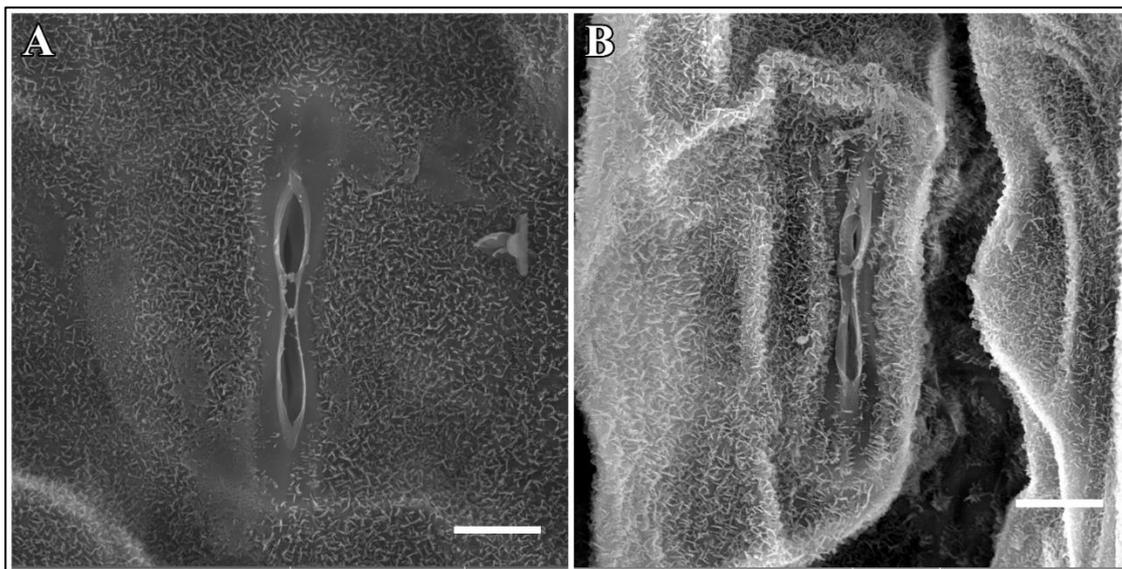


Figura 24. Efeito dos herbicidas na superfície foliar de *Setaria viridis* 96 HAA. Estômato composto por células guardas halteriformes e células subsidiárias (A-B). Diuron alterou drasticamente a morfologia dos estômatos (B). Controle (A). Barra de escala 5 μm .

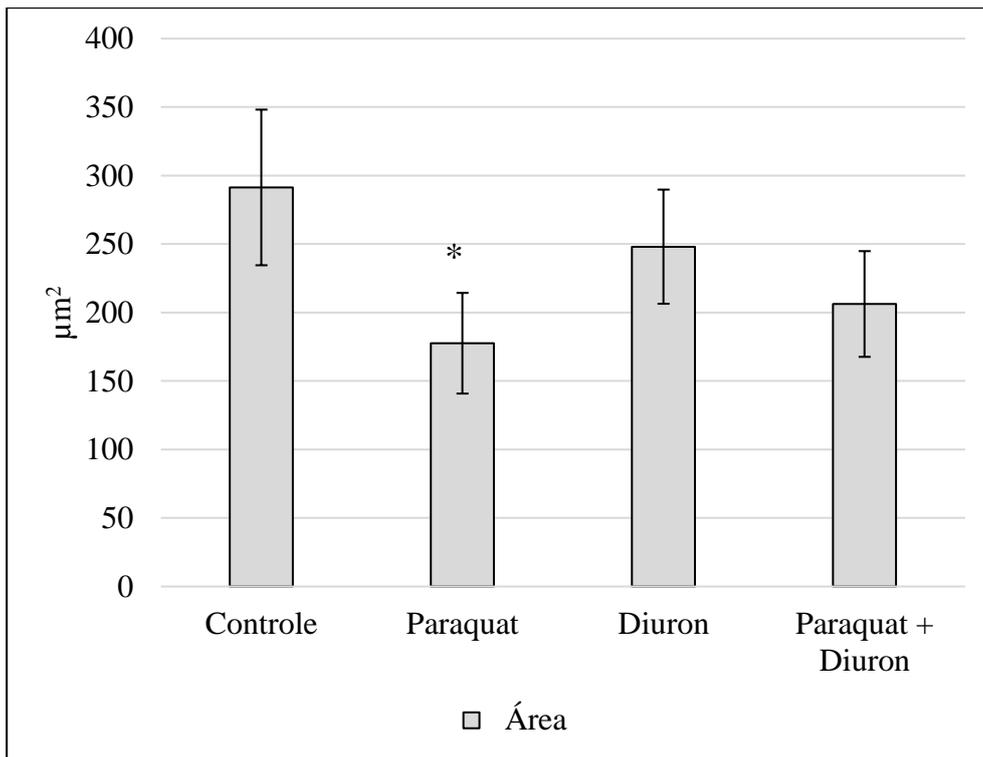


Figura 25. Efeito dos herbicidas na área dos estômatos 24 HAA. Diferentes regiões da face adaxial foram analisadas (n=20) (Anova, valor de $p < 0,001$).

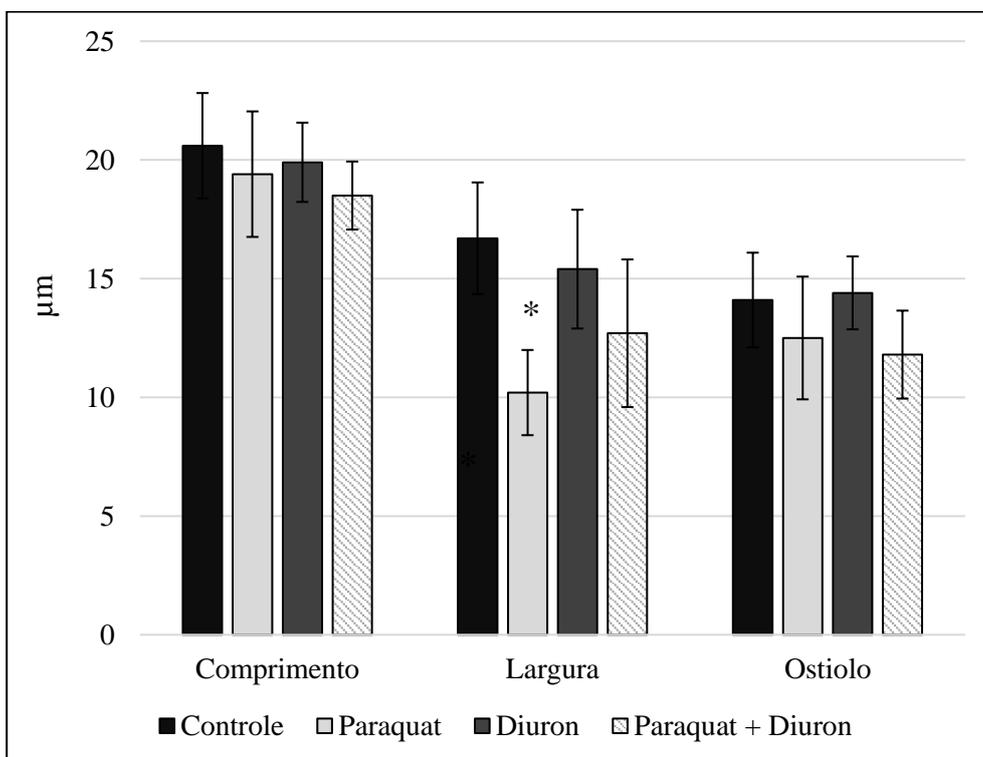


Figura 26. Efeito dos herbicidas no comprimento, largura e ostiolo 24 HAA. Diferentes regiões da face adaxial foram analisadas (n=20) (Anova, valor de $p < 0,001$).

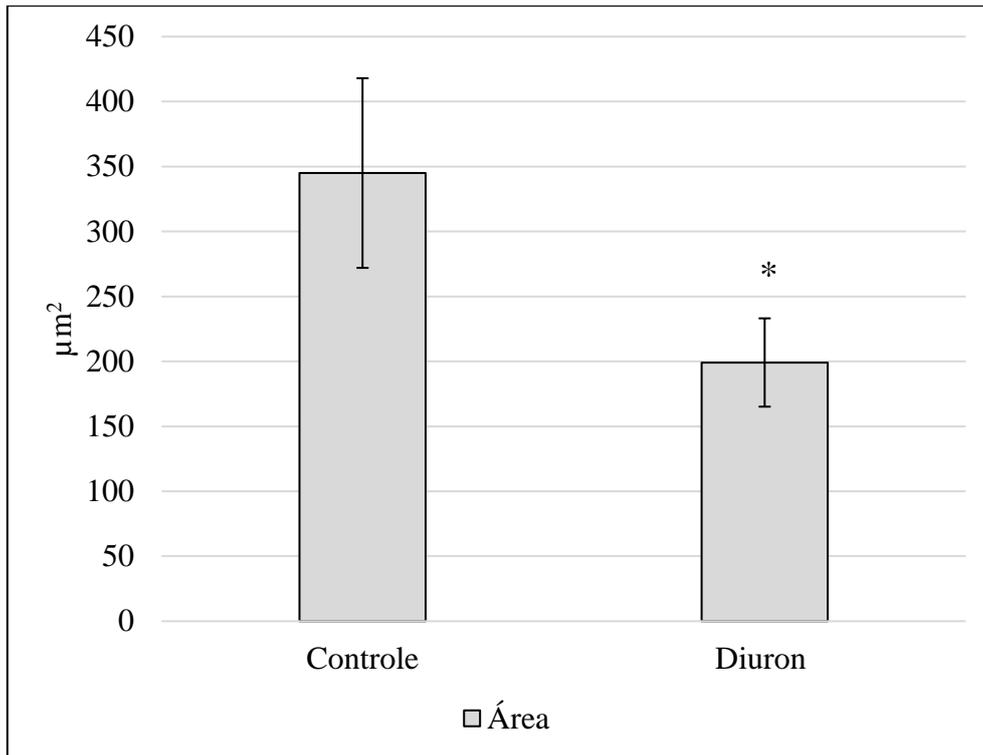


Figura 27. Efeito do Diuron na área dos estômatos 96HAA. Diferentes regiões da face adaxial foram analisadas (n=20) (Anova, valor de $p < 0,001$).

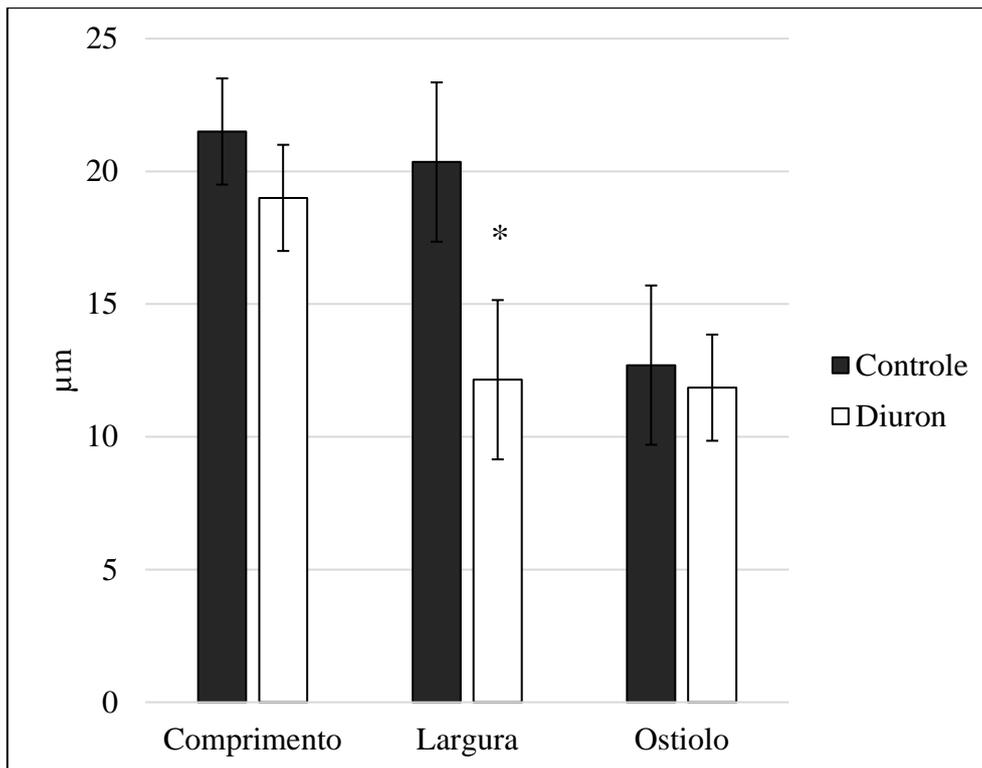


Figura 28. Efeito dos herbicidas na área dos estômatos 96 HAA. O herbicida Diuron reduziu significativamente a largura do estômato (n=20) (Anova, valor de $p < 0,001$).

4.4 Anatomia foliar

4.4.1 Controle

As análises anatômicas das folhas do tratamento controle indicam que as amostras coletadas em 24 h e 96 h mantiveram-se preservadas. As secções transversais da folha evidenciam a presença de arquitetura Kranz e padrão de nervuras característica das plantas C_4 . Observa-se feixe vascular do tipo colateral circundado por uma única camada de bainha e mesofilo homogêneo, organizado radialmente em relação ao feixe, exibindo três a quatro camadas de parênquima clorofiliano entre os feixes vasculares (Figs. 29A-B e 30A-B). O padrão de venação da seção transversal da família Poaceae mostra nervuras grandes separadas por nervuras intermediárias. Cordões de esclerênquima, localizados na área do feixe vascular, estão em contato com ambas as faces da epiderme (Figs. 29A-B e 30A-B). As células do mesofilo estavam túrgidas sendo possível identificar os cloroplastos em posição centrifuga à parede. A espessura do tecido formado pelas células

do mesofilo foi de $63 \mu\text{m} (\pm 8,0)$ (Fig. 31). As células das superfícies adaxial e abaxial da epiderme e estômatos se mantiveram bem preservadas e totalmente túrgidas (Figs. 30A-B). A espessura média das células epidérmicas na face adaxial e abaxial são $27 \mu\text{m} (\pm 7,2)$ e $24 \mu\text{m} (\pm 4,4)$, respectivamente. Em conjunto, todos os tecidos totalizaram uma espessura foliar de $115 \mu\text{m} (\pm 13,0)$ (Fig. 31).

4.4.2 Paraquat

Secções transversais das folhas mostraram alterações na anatomia da folha (Fig. 29 C-D). O herbicida Paraquat ocasionou desorganização no tecido foliar, as células do mesofilo se compactaram perdendo sua organização radial em relação ao feixe, não sendo possível identificar a posição dos cloroplastos dentro das células. A espessura do mesofilo sofreu redução significativa em comparação ao controle, evidenciando dimensões de $43 \mu\text{m} (\pm 13,6)$ (Fig. 31). Observou-se redução do espaço presente entre as nervuras no mesófilo. As células da bainha e as células epidérmicas também apresentaram diminuição do volume e intensa desorganização celular. Na face adaxial ($19 \mu\text{m} \pm 6,3$) e abaxial ($18 \mu\text{m} \pm 7,3$) da epiderme ocorreu uma redução na espessura média das células epidérmicas em comparação ao controle (Fig. 31). Além disso, as células buliformes mostraram perda aparente de turgescência (Figs. 29 C-D). Em conjunto, as alterações em todos os tecidos resultaram na redução da espessura foliar ($80 \mu\text{m} \pm 19,4$) (Fig. 31).

4.4.3 Diuron

A análise das secções de folhas após 24h da aplicação do herbicida identificou alterações anatômicas em resposta ao Diuron. Alterações mais proeminentes foram exibidas nas células epidérmicas. Em contraste, as células do mesofilo e da bainha não demonstraram alterações em sua organização e formato. A morfologia das células do mesofilo e da bainha do feixe permaneceu semelhante à observada no controle, sendo possível identificar a disposição dos cloroplastos no interior das células (Figs. 29E-F).

Apesar da aparente preservação, o herbicida causou redução significativa na espessura do mesofilo, principalmente relacionado com a diminuição dos espaços intercelulares ($26 \mu\text{m} \pm 27,5$). As células da epiderme foram as mais afetadas, tanto na face adaxial ($10 \mu\text{m} \pm 11,5$) quanto na face abaxial sofrendo redução significativa em sua espessura ($9 \mu\text{m} \pm 10,6$). Em conjunto, as alterações nas células do mesofilo e epidérmicas resultaram na redução da espessura foliar ($46 \mu\text{m} \pm 48,1$) (Fig.31). Após 96 horas, o Diuron alterou completamente a característica anatômica da folha. Todas as células do tecido vegetal apresentaram perda de turgor e conseqüente retração, perdendo o padrão de organização e a morfologia característica observadas no controle (Figs. 30C-D). O tecido do mesofilo apresentou uma espessura de $6 \mu\text{m} (\pm 11,4)$, e as células da epiderme adaxial ($3 \mu\text{m} \pm 5,5$) e abaxial ($2 \mu\text{m} \pm 3,9$) reduziram de forma significativa em relação ao controle. Tais alterações resultaram numa redução na espessura foliar ($11 \mu\text{m} \pm 19,8$) (Fig. 32).

4.4.4 Paraquat+Diuron

A análise anatômica dos cortes transversais mostrou alterações na morfologia e organização das células do mesofilo, células da bainha, células epidérmicas. As células da bainha vascular e do mesofilo tornaram-se compactas e perderam o formato e organização característicos (Figs. 29 G-H). O tecido formado pelas células do mesofilo sofreu retração e sua espessura ($33 \mu\text{m} \pm 8,7$), exibindo redução significativa em relação ao controle (Fig. 31). As células epidérmicas também perderam sua forma característica com aparente perda de turgência. Em ambas faces, adaxial e abaxial, as células epidérmicas sofreram redução na sua espessura ($13 \mu\text{m} \pm 5$). Em conjunto, todas estas alterações morfológicas causaram uma alteração na espessura da folha ($59 \mu\text{m} \pm 8,9$) (Fig. 31).

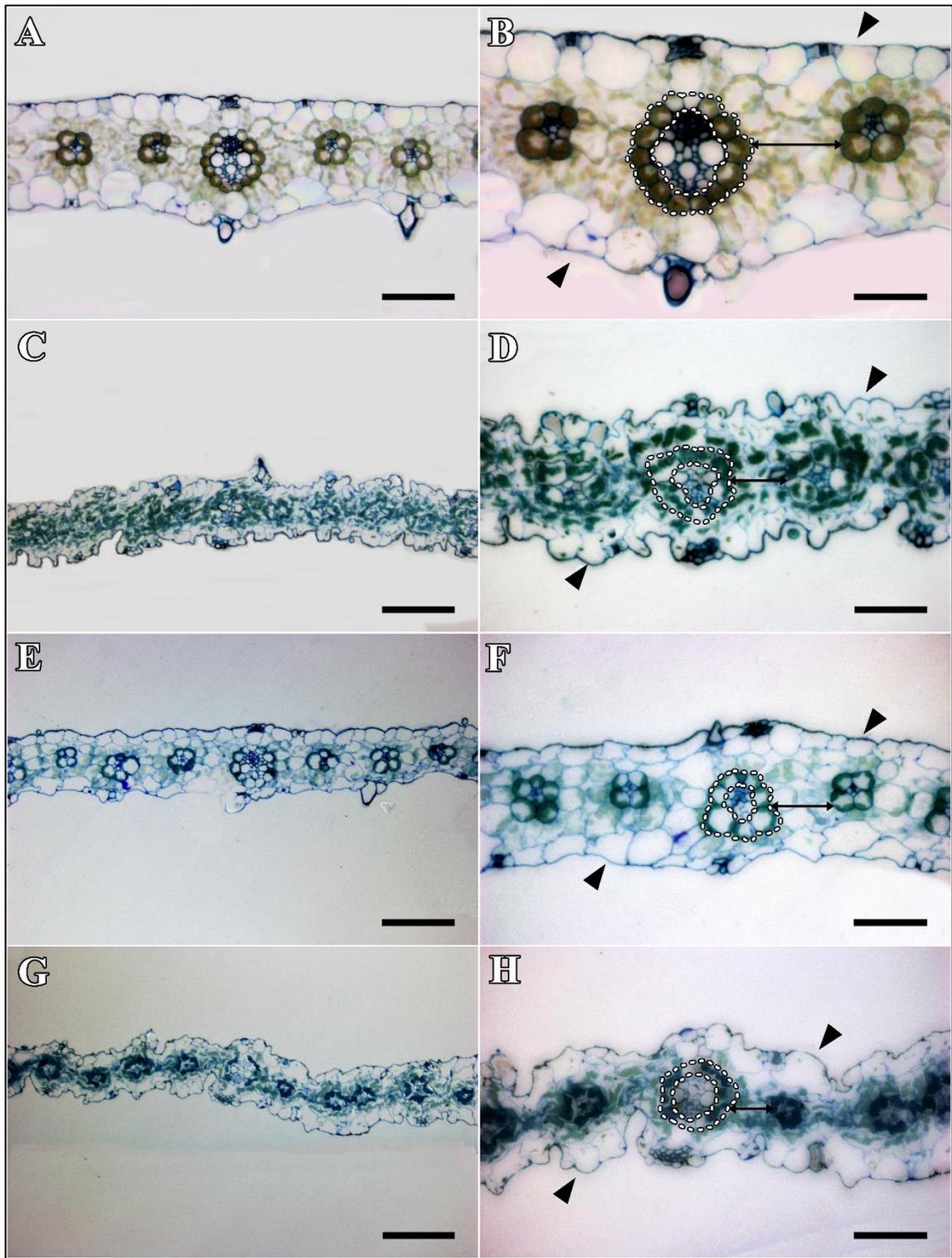


Figura 29. Efeito dos herbicidas na anatomia foliar de *Setaria viridis* 24 HAA. Controle; (A-B) Paraquat; (C-D) Diuron; (E-F); Paraquat+Diuron; (G-H). Cabeça de seta – epiderme; Seta dupla – mesofilo; Pontilhado – bainha vascular. Barra de escala 100 μm (A, C, E, G); 50 μm (B, D, F, H).

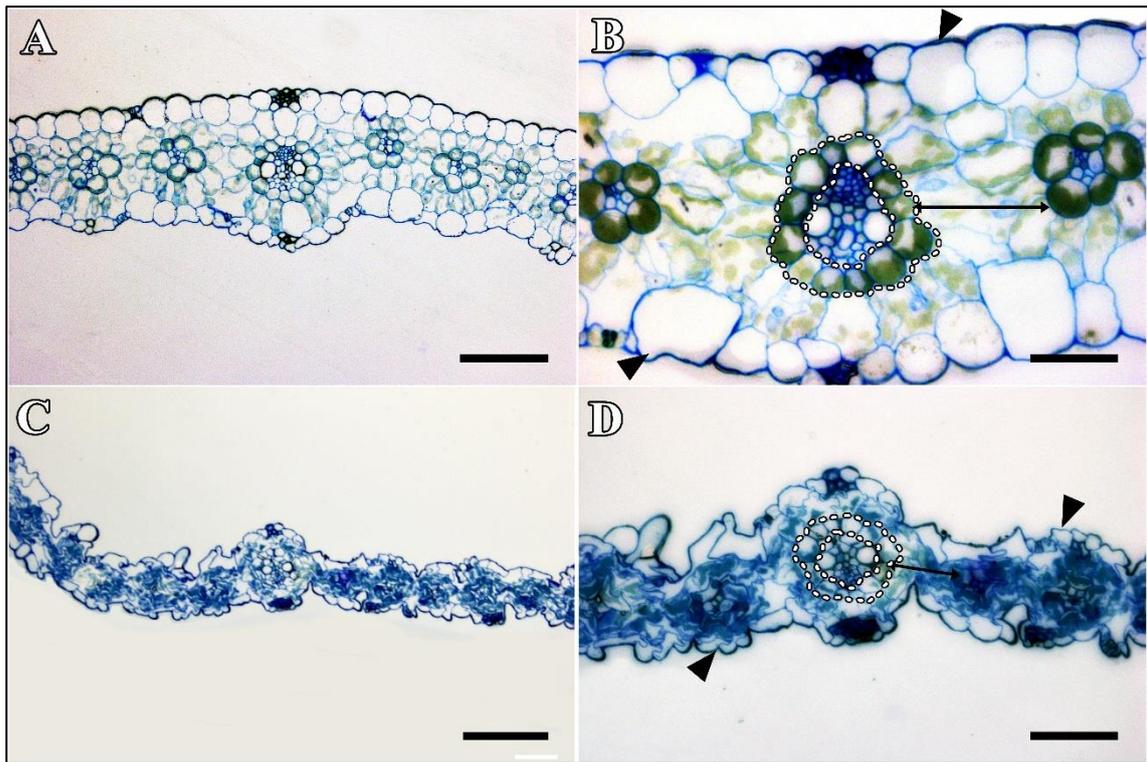


Figura 30. Efeito dos herbicidas na anatomia foliar de *Setaria viridis* 96 HAA. Controle (A-B); Diuron; (C-D). Cabeça de seta – epiderme; Seta dupla – mesofilo; Pontilhado – bainha vascular. Barra de escala 100 μ m (A, C); 50 μ m (B, D).

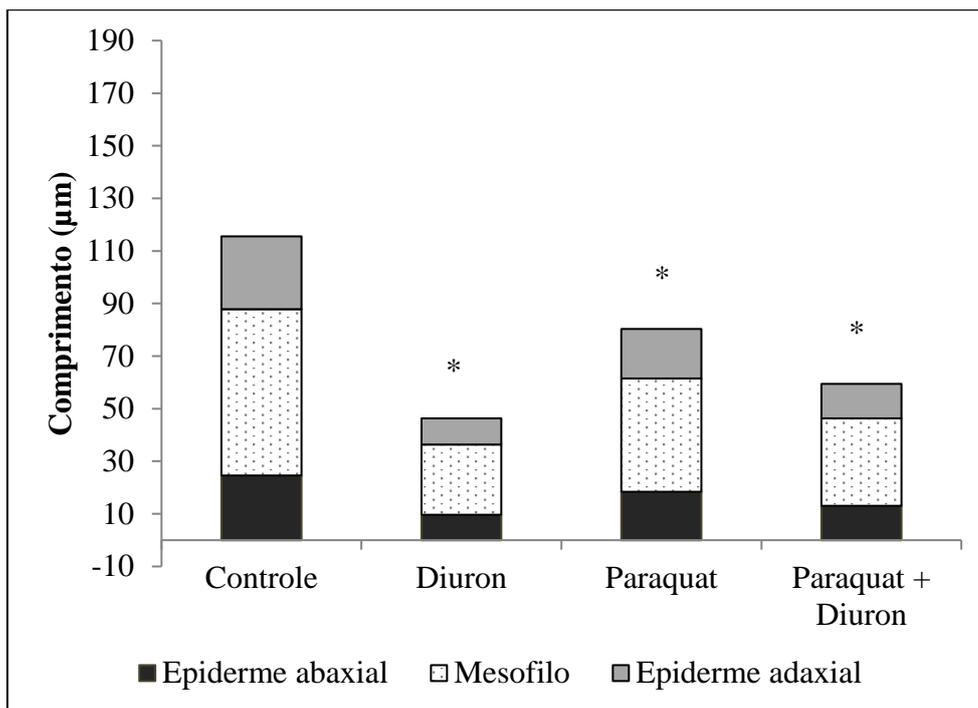


Figura 31. Efeito dos herbicidas na espessura do mesofilo, epiderme adaxial e abaxial 24 HAA (n=4) (Anova, $p < 0.001$).

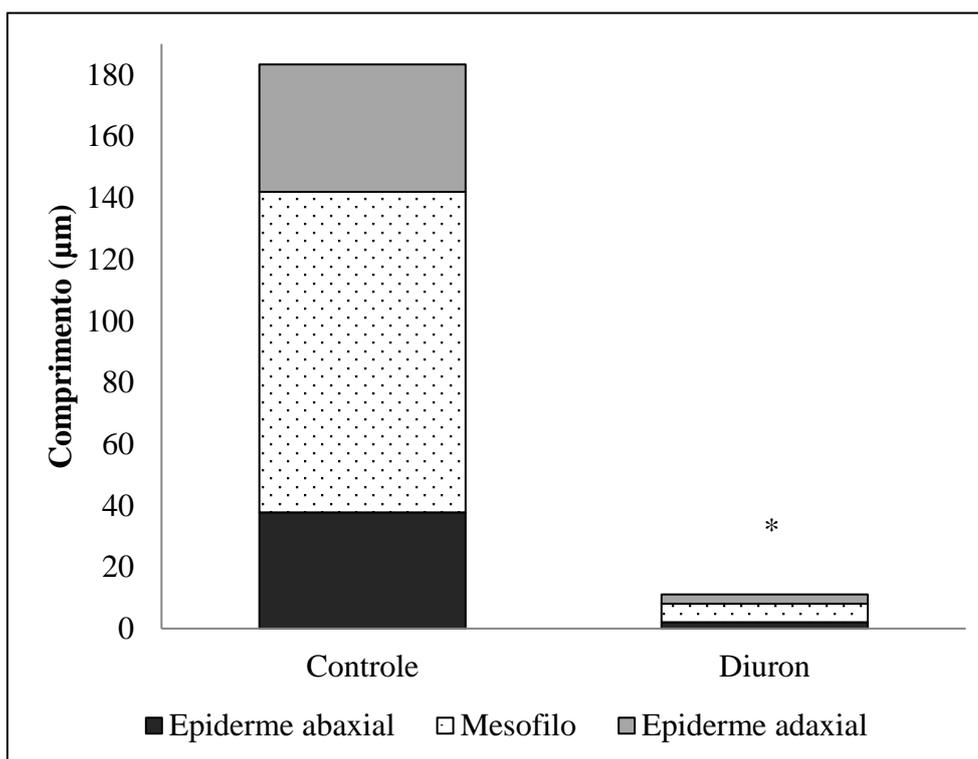


Figura 32. Efeito do Diuron na espessura do mesofilo, epiderme adaxial e abaxial 96 HAA (n=4) (Anova, $p < 0.001$).

4.5 Ultraestrutura celular

As análises ultraestruturais dos tratamentos Paraquat e Paraquat+Diuron foram realizadas somente nas amostras coletadas em 24 HAA, em virtude da intensa necrose e posterior morte das plantas após 96 HAA. Somente as plantas submetidas ao herbicida Diuron apresentam-se em condições de coleta às 96 HAA.

4.5.1 Controle

Secções transversais de folha do controle evidenciam cloroplastos da bainha vascular (BV) e do mesofilo (M) com formato predominantemente oval (Figs. 33A e 34 A-B), apresentando membranas internas e externas preservadas. No mesofilo os cloroplastos são predominantemente granais e aparentemente menores, exibindo elevado grau de empilhamento dos tilacoides (Fig. 35B). Grãos de amido e plastoglóbulos são ausentes ou estão distribuídos em quantidade reduzida (Figs. 34A-B). Plasmodesmos são observados interligando as células da bainha do feixe e do mesofilo, estruturando conexões citoplasmáticas (Fig.35B).

As células da bainha vascular apresentam cloroplastos agranais ou com presença de grana reduzidos. Membrana dos tilacoides preservada, compactada e sem espaço intratilacoide (Fig. 35A), exibindo numerosos grãos de amido e plastoglóbulos (Fig. 34A).

Em 24 h a parede celular periclinal externa das células epidérmicas apresentava-se espessada, recoberta por cutícula delgada (Fig.37A). Em 96 HAA observa-se parede celular com região mais eletrondensa abaixo da cutícula delgada (Fig. 38E).

4.5.2 Paraquat

Transcorridas 24 h da aplicação do herbicida, observa-se a desorganização das paredes das células do mesofilo e da bainha, evidenciando a perda do formato e alteração

na organização celular (Fig.33B). O citoplasma apresentava conteúdo colapsado, mais eletrondenso e as paredes estavam restritas a margear as organelas celulares destruídas nas células da bainha. Os cloroplastos da bainha vascular e do mesofilo mostravam alteração em sua forma, organização, evidenciado por aglomerações de fragmentos de grãos de amido, tilacoides e estroma.

Nas células da bainha não foi possível identificar a estrutura do cloroplasto, como as membranas tilacoides, grana e plastoglóbulos. Apenas a presença de grãos de amidos foi identificada aleatoriamente presente no citoplasma destruído (Fig.34 C). Em contraste, foi possível diferenciar os cloroplastos do conteúdo celular nas células do mesofilo, mas sua ultraestrutura estava destruída impossibilitando a identificação das suas membranas tilacoides, grana, retículos periféricos e a presença de plastoglóbulos (Fig. 34D).

Não foi possível analisar a ultraestrutura celular da mitocôndria pois todo conteúdo celular estava destruído impossibilitando a identificação da organela. A presença de plasmodesmos entre as células da bainha vascular e mesofilo também não foi identificada.

A parede celular periclinal das células epidérmicas também exibiu alterações na sua integridade e organização das fibrilas de celulose, corroborando com o padrão de observado nas análises da superfície foliar. A parede celular apresentou aparente redução na espessura, áreas de coloração mais densa intercaladas com áreas mais claras evidenciando degradação e cutícula ausente (Fig. 37B).

4.5.3 Diuron

Nas análises dos cloroplastos as 24 HAA, foram observados que as células da bainha vascular, e do mesofilo apresentaram poucas alterações ultraestruturais (Fig. 33C). Os cloroplastos da bainha vascular mantiveram suas estruturas bem preservadas e

morfologia oval característica. Foi observada a presença de membranas tilacoides com pouca formação de grana. Análise ultraestrutural dos cloroplastos evidenciou característica similar ao controle, com a presença de membranas tilacoides preservadas com pouca formação de grana (Fig. 35B). Em contraste com o observado no controle, os cloroplastos da bainha vascular não apresentaram grãos de amido, porém poucos plastoglóbulos estavam presentes (Fig. 34E).

Os cloroplastos do mesófilo tiveram sua morfologia alterada, passaram a apresentar formato mais arredondado, evidenciando aumento no espaço intra tilacoide e rompimento das membranas tilacoides e envelope (Fig. 34F). Entretanto, observou-se que os grana se mantiveram compactos e organizados (Fig. 35D). Os plastoglóbulos se tornaram mais frequentes, enquanto retículos periféricos estavam ausentes. A parede celular periclinal das células epidérmicas sofreu uma aparente redução em espessura, mas a cutícula delgada exibia depósito de substância eletrondensa (Fig. 37C).

Nas análises de 96 HAA as células da bainha vascular e do mesófilo estavam disformes, corroborando com as análises anatômicas. Os cloroplastos da bainha vascular foram degradados e se tornaram aglomerados, permitindo somente a identificação de grãos de amido dispersos no citoplasma (Fig. 36 C). Os cloroplastos do mesófilo também foram degradados e formaram aglomerados impossibilitando a identificação de suas ultraestruturas (Fig. 36D). Análises da parede das células epidérmicas exibiram parede celular com espessura reduzida com degradação parcial da cutícula e áreas eletrondensas (Fig. 38B).

4.5.4 Paraquat+Diuron

O efeito da combinação dos herbicidas Paraquat+Diuron causou danos similares ao observado no tratamento somente com Paraquat. As células da bainha vascular e do

mesofilo tiveram sua morfologia alterada, corroborando com o observado nas análises anatômicas (Fig.33D).

Os cloroplastos da bainha vascular sofreram degradação quase completa da sua integridade, sendo possível identificar apenas a presença dos grãos de amido no citoplasma (Fig. 34G). Os cloroplastos do mesofilo apresentaram estrutura amorfa e formaram aglomerados, evidenciando poucos grãos de amido preservados (Fig. 34H) A perda de organelas citoplasmáticas preservadas foi evidenciada ao longo de todas as células do mesofilo e da bainha vascular (Figs. 34G-H).

A parede celular periclinal das células epidérmicas apresenta redução na espessura, contorno sinuoso e áreas mais claras evidenciando padrão de desestruturação da parede celular (Fig.37D).

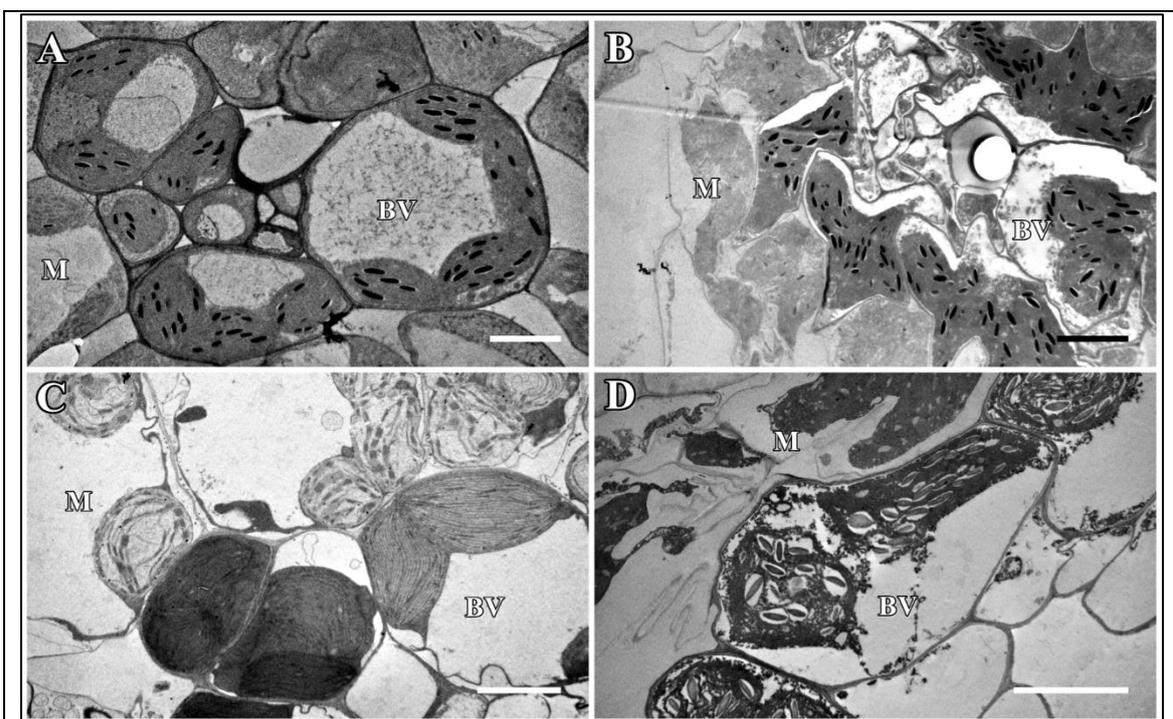


Figura 33. Efeito dos herbicidas nas células do mesofilo e da bainha vascular. Tratamento controle evidenciando a anatomia *Kranz*, cloroplastos na bainha vascular e no mesofilo na posição centrifuga. (A) Paraquat e Paraquat+Diuron ocasionaram redução do espaço intracelular e degradação dos cloroplastos (B-D). Diuron alterou o espaço intracelular, mas não afetou a parede celular da bainha vascular e do mesofilo (C). Barra de escala 10µm.

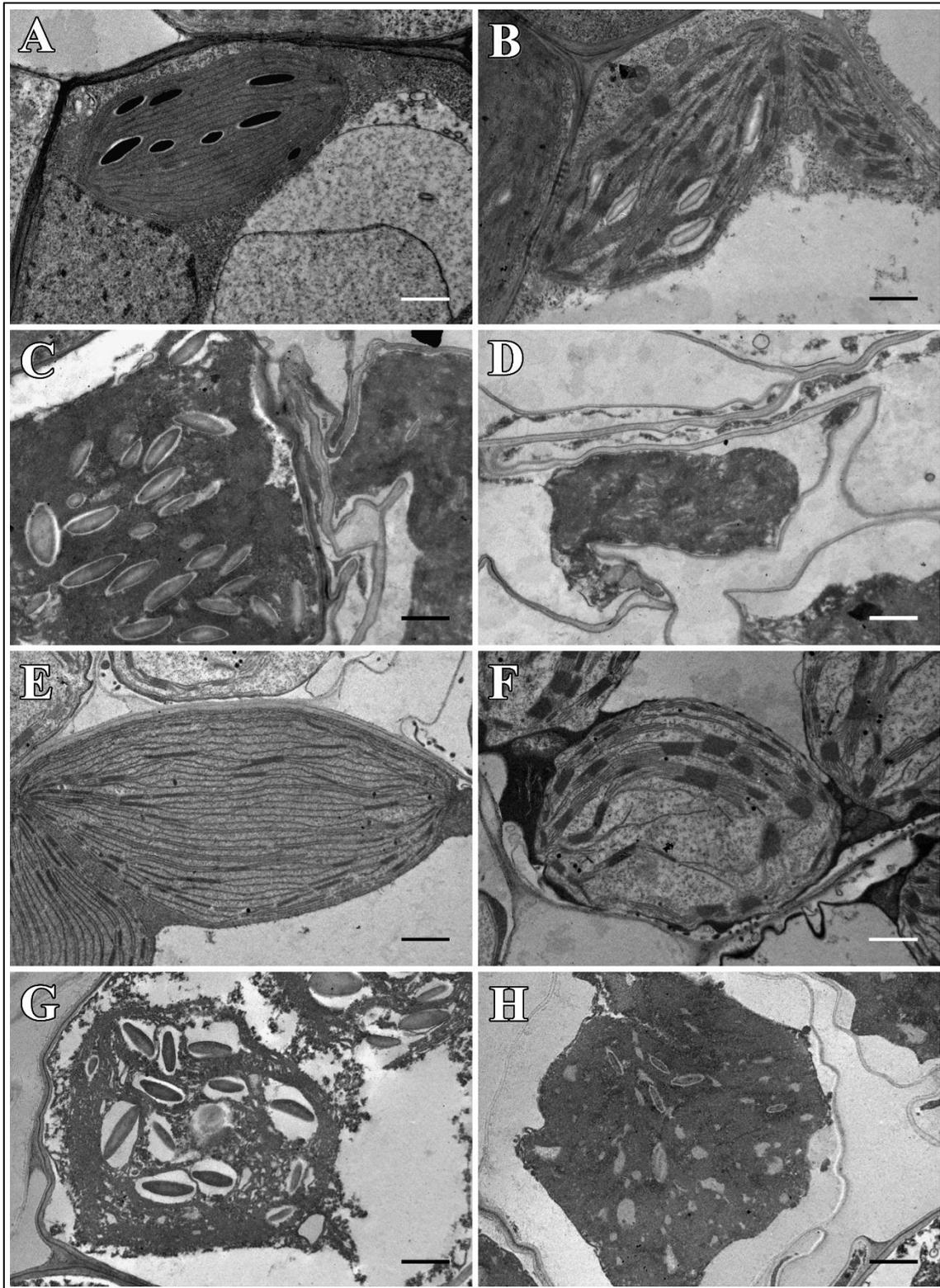


Figura 34. Efeito dos herbicidas na ultraestrutura celular dos cloroplastos da bainha vascular e do mesofilo 24 HAA. Cloroplastos da bainha vascular (A-G) Cloroplastos do mesofilo (B-F). Efeito dos herbicidas 24 HAA, Controle (A,B); Paraquat (C,D); Diuron (E,F) Paraquat+Diuron (G,H); Barra de escala 1 μ m.

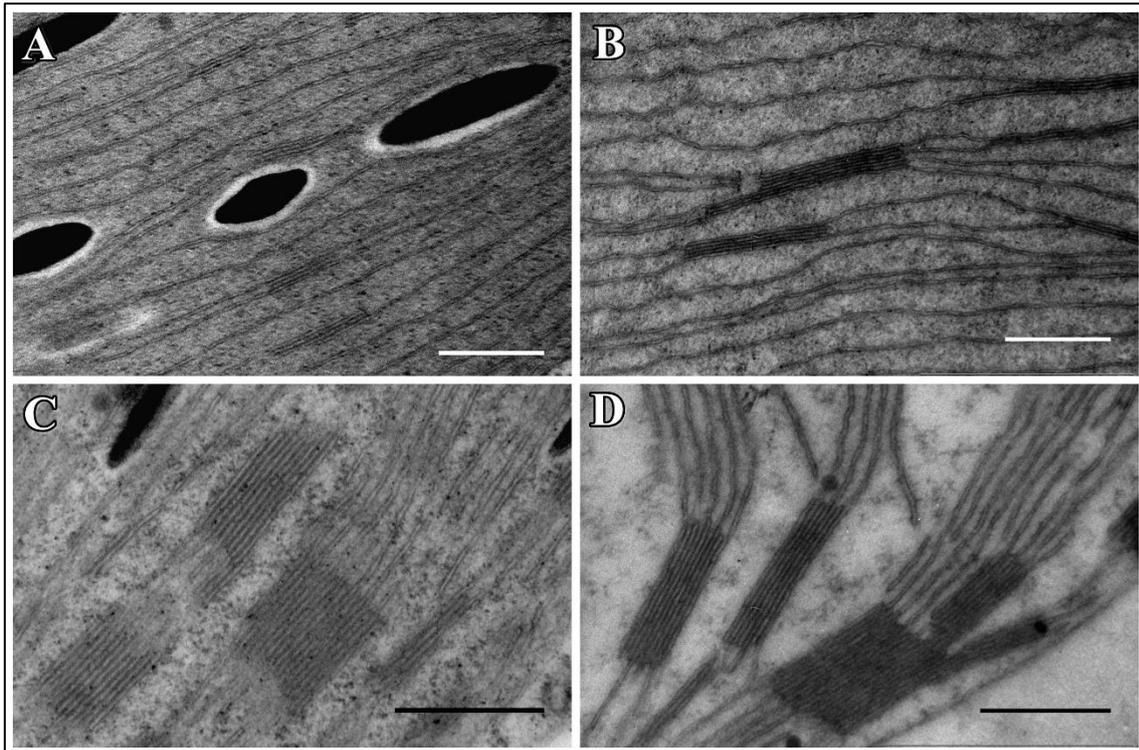


Figura 35. Efeito do herbicida Diuron após 24 HAA na organização ultraestrutural das membranas tilacoide dos cloroplastos da bainha vascular e do mesofilo. Cloroplasto da bainha vascular (A,B) Cloroplasto do mesofilo (C,D). Controle (A,C); Diuron (B,D). Barra de escala 500nm.

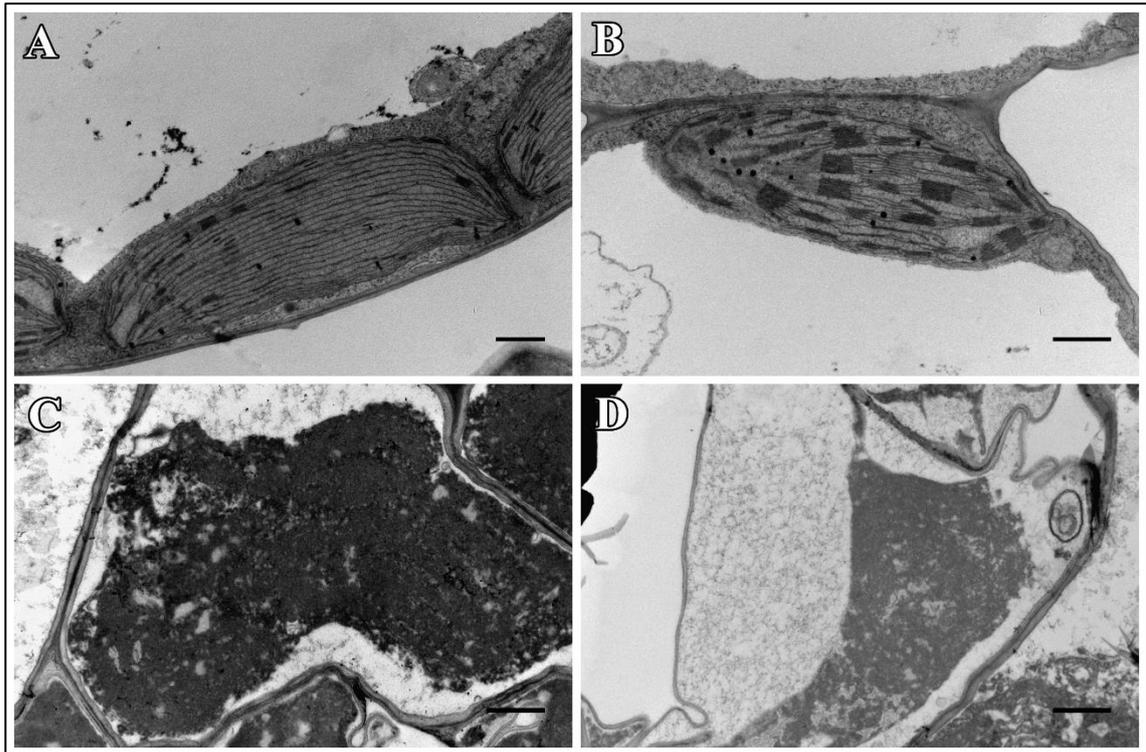


Figura 36. Efeito dos herbicidas na ultraestrutura celular dos cloroplastos da bainha vascular e do mesofilo 96 HAA Cloroplastos da bainha vascular (A-C) Cloroplastos do mesofilo (B-D). Efeito dos herbicidas 96 HAA, Controle (A-B); Diuron (C-D). Barra de escala 1 μ m.

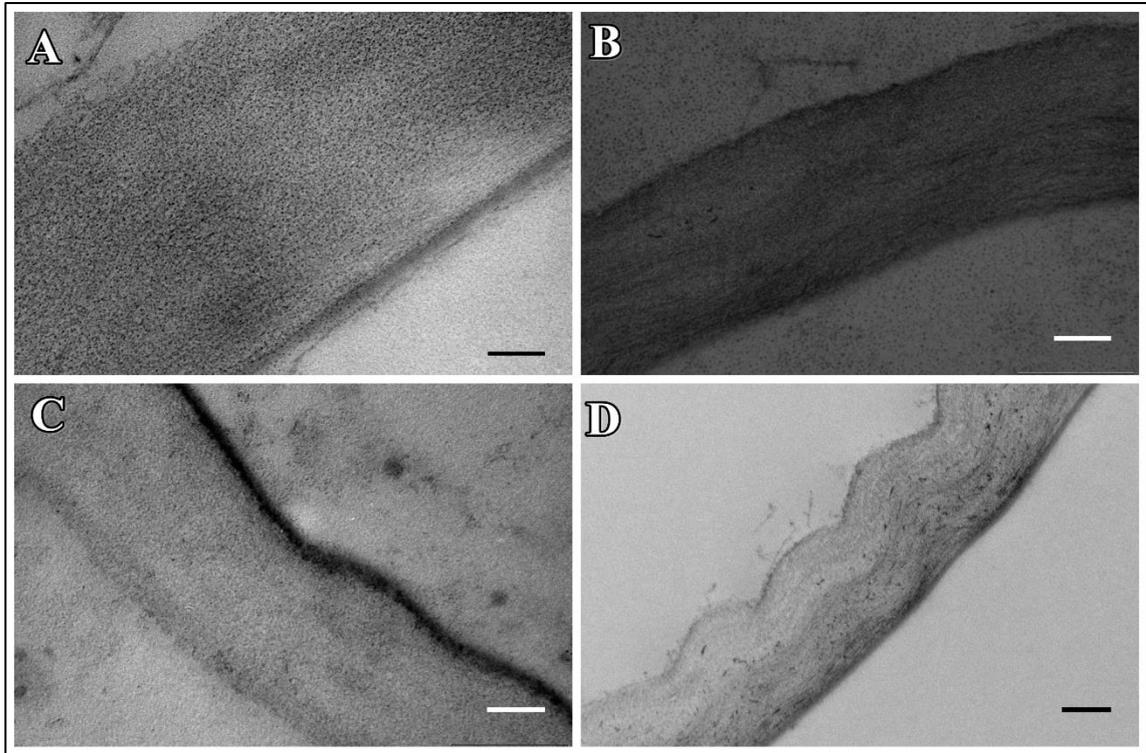


Figura 37. Efeito dos herbicidas na parede de celular da epiderme. Efeito dos herbicidas 24 HAA: Controle (A); Paraquat (B); Diuron (C), Paraquat+Diuron. Barra de escala 100nm (A-C) 200 nm (D)

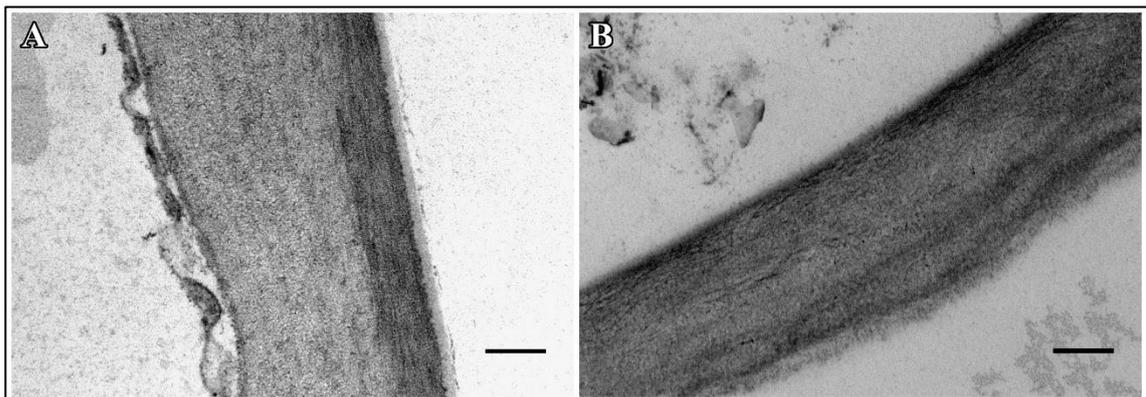


Figura 38. Efeito do Diuron na parede de celular da epiderme em 96 HAA: Controle (A); Diuron (B). Barra de escala 200 nm

5. Discussão

Plantas submetidas aos herbicidas exibiram os primeiros sintomas visuais, como clorose, murcha e necrose ainda nas primeiras horas após a aplicação. A manifestação clássica de desidratação das células e, conseqüente murcha das folhas, foi observada em todos os tratamentos com herbicidas testados e ocorre principalmente em decorrência do contato direto destes com o tecido vegetal (GUBBEL *Set al.*, 1981; GUBBEL *et al.*, 1993; MELHORANÇA, 2002). Os sintomas morfológicos evidenciados nesse trabalho para o herbicida Paraquat foram similares aos apresentados em folhas de milho, onde observou-se pontos de clorose, murcha e dessecação das folhas horas após a aplicação de Paraquat (CLAY, 2016). A necrose e redução de área foliar foram as manifestações fitotóxicas mais proeminentes quando culturas de milho foram pulverizadas diretamente com Paraquat combinado com o surfactante extravon (MAGALHÃES *Set al.*, 2000). A alta taxa de toxicidade desse herbicida foi evidenciada pela presença de necrose em folhas de milho após a deriva de Paraquat, quando este foi aplicado em altas concentrações (MAGALHÃES *et al.*, 2001). *Digitaria insularis*, vulgarmente conhecida como capim amargoso, uma das principais daninhas presentes nas culturas agrícolas brasileiras, apresenta necrose na metade da área foliar incluindo o colmo como uma das principais injúrias provocadas pelo Paraquat (GEMELLI *et al.*, 2013). *Setaria viridis* é um a gramínea que pertence ao mesmo clado que milho, sorgo, cana-de-açúcar e capim amargoso. Ao comparar os sintomas descrito para estas culturas com o nosso modelo, *Setaria viridis*, torna-se evidente que a sintomatologia após a aplicação do Paraquat foi semelhante às culturas citadas. Além disso, o amplo uso de Paraquat em culturas identificou que os marcadores fitotóxicos em folhas são determinados pela destruição das membranas celulares e produção de espécies reativas de oxigênio que ocorrem em

decorrência da depleção de NADPH e inibição da fixação de CO₂ em plantas expostas à luz (MARTINS, 2013). A presença de pontos de clorose seguida de necrose parcial ou total da folha está diretamente relacionada com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e a degradação da clorofila nas células do mesofilo em resposta à ação do herbicida (LIMA, 2017).

Herbicidas inibidores do fotossistema II são descritos por ocasionarem clorose, dessecação do tecido foliar, necrose, paralisação do crescimento e conseqüentemente à morte (OLIVEIRA *et al.*, 2011). O Diuron é um herbicida seletivo comumente usado no controle de plantas daninhas na pós emergência (MARCHI *et al.*, 2008). Plantas submetidas ao tratamento com Diuron, apresentaram clorose na superfície foliar e murcha, que progrediram para necrose como principal consequência dos danos celulares como a peroxidação lipídica (DURMU; BEKIRCAN, 2015). Em cultivares de cana-de-açúcar onde houve o controle utilizando Diuron foi observado clorose inicial nas folhas após a aplicação do herbicida (CLEMENT *et al.* 1979), também em cana-de-açúcar, foi observado que o Diuron pode ocasionar clorose seguido de necrose (MONQUERO *et al.*, 2010). Em *Setaria viridis* o padrão de resposta foi similar evidenciando a partir de 8 HAA a sintomatologia clássica: clorose na superfície foliar e murcha, que progrediram para necrose seguido de morte.

A aplicação de Paraquat+Diuron em pós-emergência constitui um procedimento amplamente utilizada no controle de plantas daninhas, especialmente em gramíneas de folhas largas, com a presença de injúrias como clorose intensa e queimaduras localizadas (CRUZ, LEIDERMAN, 1978). Em *Setaria viridis* ocasionou pontos de clorose e murcha em 8 HAA e necrose e com despigmentação foliar em 24 HAA em todas as folhas. Em alfafa foi observado que a aplicação de Paraquat+Diuron causou clorose seguida de necrose nas folhas e no caule (SILVA *et al.*, 2004). Em cana de açúcar, essa combinação

provocou queimaduras severas nas folhas e impossibilitou o desenvolvimento até a colheita (TURNER, 1981). Em folhas de abacaxi, foram observados clorose intensa seguida de necrose após a aplicação de Paraquat+Diuron, além disso, houve redução drástica no teor de clorofila total e carotenoides (CATUNDA *et al.*, 2006). Os mesmos sintomas foram observados em folhas de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) (COSTA *et al.*, 2013).

Os dois herbicidas utilizados neste trabalho geraram resposta vegetal típica, evidenciando que *Setaria viridis* não apresenta qualquer resistência a eles. Os herbicidas Paraquat e Diuron provocam a interrupção do transporte de elétrons nos fotossistemas, inibindo a fotossíntese (LINDEMANN *et al.*, 2017). Por consequência, peroxidação autocatalítica de lipídios seguida pela ruptura de membranas são comumente observados (DINIS-OLIVEIRA *et al.*, 2008; GAWARAMMANA; BUCKLEY, 2011; SOOD *et al.*, 2011), além de redução dos pigmentos clorofila, carotenoides e o aumento na atividade de enzimas relacionadas com estresse oxidativo (CASANO *et al.*, 1999; CHAGAS *et al.*, 2007) que afetam o ciclo das xantofilas (VÁRADI *et al.*, 2002; VÁRADI; DARKÓ; LEHOCZKI, 2002). O Paraquat ocasiona a redução na atividade de enzimas antioxidantes e induz o acúmulo de zeaxantina e proteínas danificadas (ITURBE-ORMAETXE *et al.*, 2002). Alterações na quantidade de pigmentos carotenóides e no ciclo da xantofilas podem ser um dos fatores para os sintomas causados devido ao estresse oxidativo, visto que os carotenóides possuem atividade antioxidante (AGNOLUCCI *et al.*, 1996; RIDLEY, 1977; STAHL; SIES, 2003). Esse conjunto de fatores previamente citados podem ser responsáveis pelo processo inicial da clorose que posteriormente progride para necrose seguindo para a morte das plantas.

Ao analisarmos a atividade fotossintética foi observado que a ação do Paraquat é extremamente rápida não tendo sido possível mensurar a atividade fotossintética após 2

HAA, quando as folhas estavam completamente murchas e iniciando o processo de necrose. Essas lesões podem estar relacionadas ao poder redutor desse inibidor que atua como aceptor de elétrons do FSI (LINDEMANN *et al.*, 2017). O Paraquat tem sítio de ação próximo à ferredoxina, agindo na captura de elétrons do FSI, impedindo sua redução e a produção de NADP⁺. A ação desse herbicida determina a produção de radicais hidroxilas e espécies reativas de oxigênio que superam os mecanismos de defesas antioxidante da planta. A sequência desses processos ocasiona danos à membrana plasmática, com posterior extravasamento do conteúdo intracelular (SOOD *et al.*, 2011). As reações subsequentes são interrompidas completamente, determinando a intoxicação da planta através da geração de radicais livres, ruptura da membrana, oxidação lipídica e de clorofilas (SOOD *et al.*, 2011; FERGUSON *et al.*, 2018). Esses efeitos causaram a morte de *Setaria viridis* em menos de 24 horas. Esta ação rápida e eficiente sobre a atividade fotossintética foi demonstrada previamente em experimentos com trigo que evidenciaram o tempo mínimo de 3 horas após o tratamento para o aparecimento dos sintomas, independente do estágio de desenvolvimento (GHORBANI *et al.*, 2011). A exposição de Paraquat em segmentos foliares de dois cultivares de milho durante 11 h reduziu os níveis de clorofila e carotenoides e induziu a fotodegradação (SOPHER *et al.*, 1999). Diferentes doses de Paraquat aplicados em pós-emergência na cultura de cana de açúcar mostraram que após 24h a menor dose (25g ia h⁻¹) reduziu significativamente o F_v/F_M em comparação ao controle. Esse decréscimo foi gradativamente proporcional à dose aplicada (PAVANI, 2013). Para uma melhor avaliação dos parâmetros fotossintéticos, tempos menores poderiam ter sido escolhidos. Em *Arabidopsis thaliana*, a ação do Paraquat ocorreu após 20 minutos de exposição, nas áreas onde havia depósito de gotículas, resultando em um declínio na eficiência quântica fotoquímica do FSII, acompanhado por um aumento nos valores da energia térmica dissipada (NPQ) e uma

diminuição concomitante nos valores da perda de dissipação de energia não regulada (NO) (MOUSTAKA; MOUSTAKAS, 2014).

A inibição da fotossíntese pelo Diuron ocorre no complexo acceptor de quinonas, o herbicida compete com a plastoquinona pelo sítio de ligação de Q_B e desloca a forma oxidada da plastoquinona ocupando o local de ligação específico para o acceptor de quinona, se acoplando ao sitio de ligação da Q_B na proteína D1 do FSII (ZER; OHAD, 1995). O Diuron não é capaz de aceitar elétrons, então o elétron não é transportado de Q_A para Q_B , interrompendo a cadeia de transporte de elétrons não cíclica e, dessa forma, a produção de ATP e NADPH. O que, por sua vez, prejudica a fixação de CO_2 no ciclo de Calvin (NAIN-PEREZ *et al.*, 2017; NOZAWA; NOGUCHI, 2018).

No presente trabalho ocorreram mudanças significativas nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*. Assim, as principais alterações foram: redução no rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_M) a partir de 2 HAA; diminuição no fluxo de energia capturado por centro de reação (TRo RC), indicando lesão na redução de Q_A ; o rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A^- para o intersistema de aceptores de elétrons (ϕE_o) também foi comprometido, houve redução rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A^- para a acceptor final de elétrons do FSI (ϕR_o); bloqueio no fluxo de transporte de elétrons (ET_0 / RC) e o índice de performance total (PI_{ABS}) diminuiu.

Aumentos nos fluxos de absorção (ABS/RC) e de dissipação total de energia de excitação não capturada (DIO/RC) indicam susceptibilidade de *Setaria viridis* à fotoinibição resultante da aplicação do herbicida. Esses parâmetros sofreram alterações a partir de 8 e 24h após a aplicação do Diuron. ABS/RC pode estar relacionado a alterações no tamanho funcional do sistema antena do FSII e ao aumento de energia capturado por

centro de reação indica alteração ou a inativação dos centros de reação (KALAJI *et al.*, 2016). Da mesma forma, pode-se inferir que o aumento na dissipação de calor não foi suficiente para impedir os danos e posterior inativação dos centros de reação do FSII.

Herbicidas inibidores como do fotossistema II agem rapidamente na fotossíntese, após 3h de incubação, o herbicida bentazon pode bloquear em até 80% a taxa de transporte de elétrons no fotossistema II (ETR), enquanto que o herbicida Diuron é capaz de bloquear 100% (DAYAN; WATSON, 2011). Similarmente, no controle de plantas daninhas, a aplicação de Diuron na pós-emergência, em diferentes espécies (*Brachiaria decumbens*, *Digitaria horizontalis*, *Panicum maximum*, *Ipomoea grandifolia*, *Ipomoea hederifolia*, e *Merremia cissoides*) ocasionou bloqueio de 100% no transporte de elétrons no fotossistema II 24 HAA (GIROTTO *et al.*, 2012). No entanto, apesar da ação rápida, já foi observado que em cana de açúcar o Diuron ocasionou redução de 50% em ETR 2 HAA. Entretanto, após esse período a cana-de-açúcar apresentou recuperação, e chegou a 70% do ETR após 240 horas (GIROTTO *et al.*, 2012).

Em soja, o efeito do herbicida bentazon foi ainda mais rápido, após 2h de incubação da dose de 500 μM foi observado a diminuição dos parâmetros ϕE_0 , ϕR_0 , ψE_0 , ET_0/RC e RE_0/RC indicando bloqueio efetivo do transporte de elétrons de Q_A para Q_B e, portanto, a incapacidade de reoxidação de Q_A , interrompendo a cadeia de transporte de elétrons (DE SOUSA *et al.*, 2014). O mesmo foi observado em milho, após 2h a dose de 500 μM de bentazon ocasionou redução nos parâmetros ET_0/RC , ψ_0 , ϕE_0 , PIABS e PIABStotal (SOUSA, 2012).

Plantas em situações adversas ativam mecanismos de supressão de estresse, como a dissipação do excesso de energia via fluorescência (BAKER; ROSENQVIST, 2004) ou mesmo através da dissipação total de energia de excitação não capturada (DIO/RC)

relacionada ao ciclo da xantofila (NIYOGI; BJORKMAN; GROSSMAN, 2002). Aqui, o aumento na dissipação total de energia de excitação não capturada (DIO/RC) não foi suficiente para evitar dos efeitos negativos do Diuron. A diminuição de TRo/RC observada em *Setaria viridis* nos tratamentos com Diuron foi uma indicação de que houve danos ao centro de reação do FSII ou limitação na transferência de energia de excitação do complexo de antenas para os centros de reações (YUAN *et al.*, 2013).

Considerando que o mecanismo de ação do Paraquat e Diuron é pelo bloqueio do fluxo de elétrons nos fotossistemas, mudanças na atividade fotossintéticas eram esperadas. O comprometimento do fotossistema pela inativação do centro de reação pela ação de inibidores testados reduziu a produção de ATP e NADPH (ASHRAF; HARRIS, 2013). Isso prejudica a fase de carboxilação, comprometendo o processo fotossintético como um todo (STACHOWSKI-HABERKORN *et al.*, 2016).

O uso do Paraquat junto com o Diuron mostrou que os efeitos do Paraquat foram inicialmente atenuados. Esse efeito pode estar associado com o efeito subdosagem (0,5D) de Diuron no transportador de elétrons do FSII. Assim, a quantidade de elétrons interceptados pelas moléculas de Paraquat no FSI foi menor. Conseqüentemente, o efeito do Paraquat seria inicialmente reduzido. No entanto, as 24 horas HAA, as plantas apresentaram a mesma aparência geral daquelas tratadas somente com Paraquat. A adição de Diuron ao Paraquat, -, aparentemente não aumentou os efeitos deletérios sobre a morfologia e fisiologia de *Setaria viridis*, sendo a atividade fotossintética igualmente prejudicada. O mesmo pode ser observado em abacaxi, onde a utilização de Paraquat+Diuron, ocasionou a redução total de F_v/F_M ao longo do tempo, evidenciando os danos irreversíveis ao aparelho fotossintético. O mesmo padrão foi observado nas análises de fluorescência máxima (F_M), constatando a redução na quantidade de energia aproveitada pela planta para realização dos processos fotoquímicos, como fixação de CO_2

e redução de NADPH (CATUNDA *et al.*, 2006). No presente trabalho os efeitos causados pela combinação dos herbicidas foram mais semelhantes aos efeitos isolados de Paraquat, do que os efeitos isolados de Diuron. Portanto a adição de Diuron ao Paraquat retarda em algumas horas o controle das plantas daninhas, com a predominância dos efeitos de Paraquat sobre os do Diuron.

A resistência ou susceptibilidade de uma planta a um determinado herbicida pode estar relacionada com a capacidade de absorção e translocação. Após a aplicação do Paraquat na superfície foliar, foi observado que as folhas de *Setaria viridis* apresentaram células epidérmicas enrugadas na parede periclinal externa, com alteração nos estômatos que se tornaram mais estreitos. Estudos mostram que Paraquat e Diuron são capazes de ocasionar redução significativa na condutância estomática (CARVALHO *et al.*, 2018; SEDIGHEH *et al.*, 2011). Além disso, Paraquat e Diuron são transcolados pela via apoplástica e, alterações no pH apoplástico pode resultar no fechamento de estômatos (GEILFUS, 2017). Adicionalmente, ao ocasionar o fechamento dos estômatos a taxa de transpiração é reduzida, concomitantemente, reduz a translocação dos herbicidas podendo concentrar os herbicidas nas células da região intercostal (LICHTENTHALER *et al.*, 2013). Nossas análises morfológicas ajudam a contribuir para uma melhor compreensão dos efeitos de Paraquat e Diuron, visto que as plantas tratadas com Paraquat apresentaram redução significativa na área e na largura dos estômatos em 24 HAA, enquanto Diuron causou redução significativa somente em 96 HAA. Alterações nas dimensões podem estar relacionadas com a redução da condutância estomática observada em outras espécies. Além disso, após analisarmos a região intercostal da superfície foliar, foi observado que todos os herbicidas utilizados causaram degradação nessa região tornando visível a presença dos fitólitos bilobares.

Apesar das alterações na superfície foliar, a densidade da cera epicuticular foi preservada. A presença de cutícula da planta não é um impedimento para a absorção de Paraquat (BISHOP et al., 1987). Mudanças na densidade da cera epicuticular não foram descritas para Paraquat, Diuron e Paraquat+Diuron ao analisar a superfície das folhas por MEV. Embora a diminuição da deposição de cera epicuticular também já tenha sido descrita e relacionada em células estomáticas em *Triticum aestivum* (YILMAZ; DANE, 2013), o mesmo não foi observado nos herbicidas utilizados no presente trabalho. Paraquat e Diuron são herbicidas com caráter hidrofílico, devido a isso apresentam baixa permeabilidade dentro da cutícula e conseqüentemente sua movimentação é menor do que herbicidas hidrofóbicos (OLIVEIRA; BACARIN 2011). As ceras epicuticulares podem funcionar como uma barreira para absorção para herbicidas hidrofílicos, porém uma vez que ocorra a difusão através da cera epicuticular existem componentes polares na cutícula para facilitar o processo de absorção. Além disso, a cerosidade, estrutura física e pilosidade da superfície foliar podem influenciar no processo de absorção do herbicida (SANTIER; CHAMEL, 1998; OLIVEIRA; BACARIN 2011).

O Paraquat é um herbicida que se transloca via xilema, sua translocação é supostamente baixa, portanto, as diferenças na translocação do Paraquat podem ser uma fonte de resistência a herbicidas. No entanto, a presença ou ausência de translocação reduzida de Paraquat em biótipos resistentes parece ser mais uma consequência do danos causados nos tecidos vasculares, do que um mecanismo de resistência (MENENDEZ et al., 2014). A luz poderia modular o efeito do Paraquat nas membranas celulares; este efeito seria mais intenso nos tecidos fotossinteticamente ativos (MENENDEZ et al., 2014) Em *Setaria viridis* o tecido foliar fotossinteticamente ativo é composto por células do mesofilo e bainha vascular. Após a análise anatômica, evidenciou-se que as células do mesofilo e da bainha vascular foram as mais afetadas pela ação do Paraquat. Em outras

espécies, foi observado que o Paraquat afeta as células da epiderme, o espaço intracelular e todas as células do tecido vegetal (MOSKOVA *et al.*, 2011). Em nossa planta modelo, a diminuição das células do mesófilo, células da bainha e das células epidérmicas podem ter contribuído para a inibição da fotossíntese, mesmo padrão observado em ervilhas (MOSKOVA *et al.*, 2011). A ação do Paraquat induziu um desenvolvimento de estresse de desidratação que afetou diretamente a desorganização tecidual e celular. Esses sintomas foram os mesmos observados para o Paraquat+Diuron, que também confirmaram respostas similares na atividade fotossintética e na morfologia. Lima e colaboradores demonstraram que a aplicação de Diuron em folhas de *Bauhinia variegata* ocasionou redução nos espaços celulares de todo tecido foliar sendo as células do mesófilo, região fotossinteticamente ativa, a região mais afetada (LIMA *et al.*, 2017). As reduções na espessura foliar e nos tecidos causados após a aplicação dos herbicidas podem ser resultado dos seus efeitos dessecantes, visto que em diferentes plantas a aplicação de Paraquat e Diuron resultou na redução do conteúdo relativo de água, peso fresco, e peso seco (ITURBE-ORMAETXE *et al.*, 2002; JIN *et al.*, 2017). Paraquat e Diuron translocam-se via xilema, porém, apesar dessa semelhança, ficou evidente que a absorção e translocação de Paraquat ocorreu mais rápido que Diuron, visto que as 24h as células do mesófilo e bainha vascular estavam completamente desorganizadas, e com espaço celular reduzido. Enquanto, nas plantas tratadas com Diuron o mesmo sintoma foi observado em 96 HAA. Nossas análises anatômicas contribuem para a compreensão da absorção e translocação dos herbicidas que evidenciam ainda que o colapso das células do mesófilo pode estar envolvido na facilitação da difusão do herbicida (HAJRI *et al.*, 2016).

As espécies reativas de oxigênio (ROS), apesar de possuírem efeitos tóxicos, podem estar relacionadas com processos fundamentais para o desenvolvimento da planta,

como ciclo celular, alongamento e morte celular, crescimento e desenvolvimento de plantas, senescência, sinalização hormonal, respostas ao estresse biótico e abiótico e interação simbiótica com microrganismos (BUSTOS *et al.*, 2008; MITTLER *et al.*, 2004; MUÑOZ *et al.* 2011; RODRIGUEZ *et al.*, 2010). A ação sinalizadora ou tóxica das ROS para a planta depende da proporção e localização subcelular, sua função como moléculas sinalizadoras está intrinsecamente relacionada à interação com antioxidantes não enzimáticos, como o ascorbato e a glutathione, que são tampões redox e moléculas sinalizadoras (FOYER; NOCTOR 2005a, 2005b).

O Paraquat é um potente indutor de estresse oxidativo, porque inibe a regeneração do ácido ascórbico, equivalentes redutores e compostos antioxidantes e aumenta a produção de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), oxigênio singlete (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH), além de inibir a regeneração de equivalentes redutores e compostos antioxidantes (LASCANO *et al.*, 2012). Um dos principais alvos do estresse oxidativo são as membranas celulares, ácidos graxos poli-insaturados são comumente peroxidados, como consequência ocorre redução na fluidez e seletividade das membranas plasmáticas (HALLIWELL *et al.*, 1999; HALLIWELL, 2006).

Os marcadores microscópicos apresentados nesse trabalho evidenciam que *Setaria viridis* apresenta alterações que caracterizam o processo de aceleração da senescência foliar como o principal mecanismo de resposta à ação dos herbicidas. Este processo envolve alterações moleculares, bioquímicas, fisiológicas e morfológicas constituídas pela redução da eficiência fotossintética e diminuição da concentração de clorofila assim como promove o aumento do extravasamento de íon e da expressão de genes associados a senescência (GSAs) (SARWAT *et al.*, 2013). Os cloroplastos são os sítios iniciais de aparecimento de sintomas da resposta (SOUDRY *et al.*, 2005) e

apresentam aumento em número de plastoglobulos que estão envolvidos nos processos de peroxidação lipídica.

Neste trabalho, foi observada a presença de plastoglobulos nos cloroplastos das células do mesofilo e da bainha vascular em 24 HAA de Diuron. A presença dessas estruturas pode ser um indicativo do início do processo de estresse oxidativo. Shao e colaboradores propõem que o aumento na quantidade de plastoglobulos pode ser resultado da degradação da membrana dos tilacoides (SHAO et al., 2016b), entretanto, Xu e colaboradores sugerem que o aumento dessas estruturas está diretamente relacionado a peroxidação lipídica (XU; ZHOU; SHIMIZU, 2009b). O aumento na quantidade de plastoglobulos também está relacionado com o processo de senescência (GHOSH et al., 2001; TEVINI; STEINMULLER, 1985).

Propõem-se que a absorção celular de Paraquat em células vegetais seja mediada principalmente por sistemas de transporte de poliamina (HART et al., 1992), devido à similaridade estrutural com o substrato natural dos transportadores (FUJITA; SHINOZAKI, 2014). Recentemente, relatou-se que um transportador de aminoácidos do tipo L de *Arabidopsis* ligado à membrana plasmática e um transportador de cassete de ligação ao ATP estavam envolvido na captação de Paraquat (FUJITA et al., 2012; XI et al., 2012). Uma vez dentro do citoplasma, o Paraquat precisa atingir os cloroplastos onde seu local de ação está localizado, embora não esteja claro se o Paraquat se difunde ou é ativamente transportado para o estroma do cloroplasto (LI et al., 2013). Os dados obtidos através das análises ultraestruturais das folhas de *Setaria viridis* tratadas com Paraquat e Paraquat+Diuron confirma o efeito rápido e danoso dos herbicidas a ultraestrutura celular dos cloroplastos da bainha vascular e do mesofilo. A geração de ROS pelo Paraquat pode ser as causas da destruição celular dos cloroplastos da bainha vascular e do mesofilo, tanto no tratamento somente com Paraquat quanto no tratamento combinado de

Paraquat+Diuron. Além das alterações nos cloroplastos observou-se também alterações na parede das células da epiderme e mesofilo. Apesar da cera epicuticular funcionar como uma barreira para herbicidas hidrofílicos como Paraquat e Diuron, a cutina é composta majoritariamente de ácidos graxos polimerizados hidroxilados além de grupos carboxil e hidroxil, conferindo-a característica hidrofílica. Devido a isso, herbicidas hidrofílicos são conseguidos ser absorvidos (DAN HESS 1994). Além de hidrofílicos, Paraquat e Diuron translocam-se via apoplástica. Ao analisarmos a ultraestrutura da parede celular foi observado uma aparente redução na espessura da parede celular, exibindo sinais de afrouxamento do conteúdo da parede celular e redução na fina camada de cutina. A presença de espécies reativas de oxigênio e o acúmulo de peróxido de hidrogênio podem estar corroborar com as alterações nas paredes celulares (CHAUHAN *et al.*, 1998; DODGE *et al.*, 2008; HU *et al.*, 2005).

Plantas submetidas a tratamento com Diuron sobreviveram por todo o período do experimento (96 HAA). Análises ultraestruturais realizadas em 24 HAA evidenciaram que cloroplastos da bainha vascular não sofreram alterações na organização celular, e na ultraestrutura das membranas tilacoides estromais e nos grana, mas houve ausência de grãos de amido. Os cloroplastos do mesofilo foram os mais afetados, perderam sua forma característica, e apresentaram aumento no espaço intratilacoide e ruptura de membranas, mas os grana mantiveram sua ultraestrutura compacta e preservada. Em contraste, nas análises fisiológicas ficou evidente a redução da atividade fotossintética as 24 HAA para todas as doses testadas. A via fotossintética das plantas apresenta dois fluxos de transferência de elétrons, linear e cíclica. Na transferência linear (TLE) os elétrons são mobilizados de ambos fotossistemas através de complexos Cytb6f ligados a membrana e portadores de carreadores como a plastoquinona, plastocianina e ferredoxina. Na transferência cíclica (TCE) o fluxo de elétrons ocorre somente no fotossistema I. O

NADPH pode ser gerado somente através do LET, enquanto a síntese de ATP é acoplada a ambos os mecanismos de transferência de elétrons (ALLEN, 2003). Quando ocorre mudanças no metabolismo ou em situações de estresse, plantas são capazes de mudar o modo do fluxo de elétrons entre TLE e TCE para manter uma relação ATP/NADPH. (HASHIMOTO *et al.*, 2004; MUNEKAGE; SHIKANAI, 2005). As análises fotossintéticas realizadas nesse trabalho mensuram a atividade fotossintética do fotossistema II. Em 24 HAA evidenciaram redução nos parâmetros relacionados a transferência linear de elétrons linear (ϕE_0), aumento no rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A para o aceptor final de elétrons do FSI (ϕR_0) e aumento? na medida do tamanho aparente do sistema antena ou o fluxo de absorção por RC (ABS/RC). Tais alterações observadas no fluxo de elétrons, em conjunto com preservação ultraestrutural dos cloroplastos da bainha vascular indicam que pode ter ocorrido uma mudança no fluxo de elétrons linear para cíclico.

Tal hipótese pode ser corroborada pelo trabalho de Jin e colaboradores (JIN *et al.*, 2017), onde dois mutantes de *Arabidopsis thaliana*, *pgr5* – deficiente em atimicina A, sensível ao fluxo cíclico da ferredoxina a plastoquinona, e o mutante *ndf4* – deficiente em NADH dependente fluxo cíclico de NADPH a plastoquinona, foram tratados com Diuron. Após as análises ficou evidente que o mutante *pgr5* foi o mais suscetível ao Diuron. Em nosso modelo, tanto o fluxo cíclico pela PGR5, quanto pela NADH estão viáveis tornando possível um melhor desempenho do fluxo cíclico mesmo na presença de Diuron. Além disso, já foi observado que em cloroplastos da bainha vascular pode ocorrer o aumento do fluxo cíclico de elétrons, mas o mecanismo ainda não está bem elucidado (MAJERAN *et al.*, 2010).

6. Conclusão

A exposição de *Setaria viridis* aos herbicidas Paraquat, Diuron e Paraquat+Diuron afetou a morfologia, estrutura e fisiologia de folhas evidenciando sensibilidade dessa espécie à ação dos inibidores de fotossíntese. As plantas analisadas apresentaram graus progressivos de danos em folhas pré-existentes de acordo com o aumento da concentração das doses empregadas.

Setaria viridis pertence ao clado das principais plantas de importância agrícola mundial e das plantas daninhas mais danosas a agricultura. De forma conjunta, as alterações observadas na morfologia, anatomia e ultraestrutura celular em folhas de *Setaria viridis* fornecem elementos que corroboram para a melhor compreensão do efeito de Paraquat e Diuron, principalmente em plantas com metabolismo fotossintético C₄, evidenciando o potencial de *Setaria viridis* como modelo para estudar o efeito de herbicidas tanto em plantas de importância econômica quanto plantas daninhas.

As análises presentes nesse estudo se mostraram eficientes para determinar as concentrações ótimas de emprego desses herbicidas em *Setaria viridis*, assim como todas as alterações presentes após a exposição. Adicionalmente, a rápida e fácil identificação das manifestações de sintomas macroscópicos e microscópicos revelam viabilidade para estudos de monitoramento de novos herbicidas, elucidação de rotas de absorção e sítios de ação, assim como o reconhecimento das assinaturas de resistência e suscetibilidade especialmente para plantas daninhas da família Poaceae com mecanismo fotossintético C₄.

7. Referências

ADAPAR. **Agência de Defesa Agropecuária do Paraná.**

ADATSI, F. K. **Forensic Toxicology.** [s.l: s.n.].

AGNOLUCCI, L. et al. Amitrole effects on chloroplasts of barley plants grown at different temperatures. **Journal of Plant Physiology**, v. 147, n. 5, p. 493–502, 1996.

AGOSTINETTO, D. et al. Resistência de plantas aos herbicidas inibidores da enzima acetil coenzima A carboxilase (ACCase). **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 3, n. 2–3, p. 155, 10 dez. 2002.

ALLEN, J. F. Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain. **Trends in Plant Science**, v. 8, n. 1, p. 15–19, jan. 2003.

ALLEN, J. F.; FORSBERG, J. Molecular recognition in thylakoid structure and function. v. 6, n. 7, p. 317–326, 2001.

ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Photosynthesis under stressful environments: An overview. **Photosynthetica**, v. 51, n. 2, p. 163–190, 2013.

AUSTIN, J. R. Plastoglobules Are Lipoprotein Subcompartments of the Chloroplast That Are Permanently Coupled to Thylakoid Membranes and Contain Biosynthetic Enzymes. **the Plant Cell Online**, v. 18, n. 7, p. 1693–1703, 2006.

BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 403, p. 1607–1621, 2004.

BALDWIN, A. et al. Fatty acid elongation is important in the activity of thiocarbamate herbicides and in safening by dichlormid. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 385, p. 1289–1294, 2003.

BENNETZEN, J. L. et al. Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. **Nature biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 555–61, 2012.

BISHOP, et al., Mechanism of Paraquat resistance in *Hordeum glaucum*. II. Paraquat uptake and translocation. **Aust. J. Plant Physiol.** 14, 539–547, 1987.

BOOTE, K. J. Coupling Pests to Crop Growth Simulators to Predict Yield Reductions. **Phytopathology**, v. 73, n. 11, p. 1581, 1983.

BRASIL; ANVISA. RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 190, DE 30 DE NOVEMBRO DE 2017. **Diário Oficial da União**, n. 230, p. 1–5, 2017.

BRÄUTIGAM, A.; WEBER, A. P. M. Chapter 11 Transport Processes: Connecting the Reactions of C₄ Photosynthesis. In: RAGHAVENDRA, A. S.; SAGE, R. F. (Eds.). . **C₄ Photosynthesis and Related CO₂ Concentrating Mechanisms**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011. p. 199–219.

BRÉHÉLIN, C.; KESSLER, F.; VAN WIJK, K. J. Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 6, p. 260–266, 2007.

BRUTNELL, T. P. et al. *Setaria viridis*: a model for C₄ photosynthesis. **The Plant cell**, v. 22, n. 8, p. 2537–2544, 2010.

CARVALHO, A. R. J. et al. Physiological Variables in Pineapples Submitted to the Application of Diuron. **Planta Daninha**, v. 36, n. 0, p. 1–9, 29 out. 2018.

CASANO, L. M. et al. Leaf age- and Paraquat concentration-dependent effects on the levels of enzymes protecting against photooxidative stress. **Plant Science**, v. 149, n. 1, p. 13–22, 1999.

CATUNDA, M. G. et al. Efeitos de herbicidas na atividade fotossintética e no crescimento de abacaxi (*Ananas comosus*). **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 115–121,

2006.

CHAGAS, R. M. et al. Photochemical damage and comparative performance of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in sugarcane leaves exposed to Paraquat-induced oxidative stress. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 90, n. 3, p. 181–188, 2007.

CHAUHAN, L. K. S. et al. Diuron-induced cytological and ultrastructural alterations in the root meristem cells of *Allium cepa*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 62, n. 3, p. 152–163, 1998.

CHRISTOFFOLETI, P. J. CURVAS DE DOSE-RESPOSTA DE BIÓTIPOS RESISTENTE E SUSCETÍVEL DE *Bidens pilosa* L. AOS HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS. **Scientia Agricola**, v. 59, p. 513–519, 2002.

CLAY, S. A. Herbicide injury to corn. In: CLAY, D. E. et al. (Eds.). **iGrow Corn: Best Management Practices**. [s.l: s.n.]. p. 41–42.

COBB, A. H.; READE, J. P. H. **Herbicides and Plant Physiology**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2010.

COSTA, N. V. et al. DIRECTED-SPRAY APPLICATION OF PARAQUAT AND DIURON IN PHYSIC NUT PLANTS. **Planta Daninha**, v. 31, n. 4, p. 987–996, 2013.

CRUZ, L. S. P.; LEIDERMAN, L. Aplicação de misturas de Diuron com MSMA, e com Paraquat, no controle de plantas daninhas de folhas largas em cultura de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). **Planta Daninha**, v. 1, n. 1, p. 45–50, jan. 1978.

DAYAN, F. E.; WATSON, S. B. Plant cell membrane as a marker for light-dependent and light-independent herbicide mechanisms of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 101, n. 3, p. 182–190, 2011.

DE SOUSA, C. P. et al. Photosynthesis of soybean under the action of a photosystem II-inhibiting herbicide. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 11, p. 3051–3062, 2014.

DÉLYE, C.; JASIENIUK, M.; LE CORRE, V. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 11, p. 649–658, 2013.

DÉLYE, C.; JASIENIUK, M.; LE CORRE, V. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. v. 29, n. 11, p. 649–658, 2013.

DINIS-OLIVEIRA, R. J. et al. Paraquat poisonings: Mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 13–71, 2008.

DODGE, A. D. et al. Paraquat Resistance in Conyza. **Plant Physiology**, v. 77, n. 4, p. 984–989, 2008.

DOTRAY, P. A. et al. Effects of Acetyl-Coenzyme A Carboxylase Inhibitors on Root Cell Transmembrane Electric Potentials in Graminicide-Tolerant and -Susceptible Corn (*Zea mays* L.). **Plant Physiology**, v. 103, n. 3, p. 919–924, 1 nov. 1993.

DOUST, A.; DIAO, X. **Genetics and Genomics of Setaria**. [s.l: s.n.]. v. 19

DRINCOVICH, M. et al. Chapter 14 C 4 Decarboxylases: Different Solutions for the Same Biochemical Problem, the Provision of CO₂ to Rubisco in the Bundle Sheath Cells. **Adv. Photosynth. Respir.**, v. 32, 2011.

E. EDWARDS, G.; VOZNESENSKAYA, E. **Chapter 4 C4 Photosynthesis: Kranz Forms and Single-Cell C4 in Terrestrial Plants C4 Photosynthesis and Related CO₂ Concentrating Mechanisms**, 2011.

EDWARDS, G. E. et al. Compartmentation of photosynthesis in cells and tissues of C(4) plants. **Journal of experimental botany**, v. 52, n. 356, p. 577–590, 2001a.

EDWARDS, G. E. et al. What does it take to be C4? Lessons from the evolution of C4 photosynthesis. **Plant physiology**, v. 125, n. 1, p. 46–49, 2001b.

FAYEZ, K. A. Action of Photosynthetic Diuron Herbicide on Cell Organelles and Biochemical Constituents of the Leaves of Two Soybean Cultivars. v. 115, p. 105–115, 2000.

FERGUSON, J. C. et al. Effect of spray droplet size on herbicide efficacy on four winter annual grasses. **Crop Protection**, v. 112, p. 118–124, 2018.

FONTES, J. R. A. . et al. **Manejo Integrado de Plantas Daninhas**. 1. ed. Planantina, DF, Embrapa Cerrados: Embrapa, 2003.

FRANKE, W. Ectodesmata in relation to binding sites for inorganic ions and urea on isolated cuticular membrane surfaces. **American journal of botany**, v. 56, n. 4, p. 432–435, 1969.

FRANS, R. et al. **Experimental design and techniques for measuring and analyzing plant responses to weed control practices**. 3rd. ed. [s.l.] Weed Science Society of America, 1986.

FUJITA, et al., Natural variation in a polyamine transporter determines Paraquat tolerance in Arabidopsis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 109, 6343–6347, 2012.

FUJITA, M., e SHINOZAKI, K. Identification of polyamine transporters in plants: Paraquat transport provides crucial clues. **Plant Cell Physiol.** 55, 855–861, 2014.

GAWARAMMANA, I. B.; BUCKLEY, N. A. Medical management of Paraquat ingestion. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 72, n. 5, p. 745–757, 2011.

GEILFUS, C. The pH of the Apoplast : Dynamic Factor with Functional Impact Under Stress. **Molecular Plant**, v. 10, n. 11, p. 1371–1386, 2017.

GEMELLI, A. et al. Estratégias para o controle de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao glyphosate na cultura milho safrinha. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 12, n. 2, p. 162, 10 ago. 2013.

GHORBANI, M. et al. Oxidative stress and leaf senescence. **BMC Research Notes**, v. 4, n. 1, 2011.

GHOSH, S. et al. Ultrastructural and biochemical changes in chloroplasts during *Brassica napus* senescence. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 777–784, 2001.

GIROTTO, M. et al. Photosynthetic Efficiency of Sugarcane Cultivars and Weed Species after Diuron Application. v. 30, n. 3, p. 599–606, 2012.

GLAIZAL, M. et al. Paraquat Poisonings in France during the European Ban: Experience of the Poison Control Center in Marseille. **Journal of Medical Toxicology**, v. 9, n. 2, p. 144–147, 2013.

GRIGOROVA, B. et al. Drought, high temperature, and their combination affect ultrastructure of chloroplasts and mitochondria in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. **Journal of Plant Interactions**, v. 7, n. 3, p. 204–213, 2012.

GRONWALD, J. W. **Lipid Biosynthesis Inhibitors** **Weed Science**. [s.l.: s.n.]. Disponível em:

<<https://pdfs.semanticscholar.org/eb37/bfc7d7e69601052a73b48b601eeadd4d0a10.pdf>>

.

GUBBELS, G. H.; BONNER, D. M.; KENASCHUK, E. O. Effect of time of swathing and desiccation on plant drying, seed color and germination of flax. **Canadian Journal**

of **Plant Science**, v. 73, n. 4, p. 1001–1007, out. 1993.

GUBBELS, G. H.; KENASCHUK, E. O.; KNNESCUUR, G. H. DESICCATION OF FLAX WITH DIQUAT. **Canadian Journal of Botany**, v. 61, p. 575–581, 1981.

GUNNING, B.; STEER, M. **Plant Cell Biology: Structure and Function**. [s.l.] Jones and Bartlett Publishers, Inc., 1996. v. 189

HART, J. et al., Transport interactions between Paraquat and polyamines in roots of intact maize seedlings. **Plant Physiol.** 99, 1400–1405, 1992.

HASHIMOTO, M. et al. Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. **Nature**, v. 429, n. 6991, p. 579–582, 2004.

HATCH, M. D. C₄ photosynthesis: a unique mena of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. In: **Biochimica et Biophysica Acta**. [s.l: s.n.]. v. 895p. 81–106.

HATCH, M. D.; SLACK, C. R. Photosynthetic CO₂-Fixation Pathways. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 21, n. 1, p. 141–162, jun. 1970.

HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTO, J. J. **O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro**. [s.l: s.n.].

HU, X. et al. Abscisic acid-induced apoplastic H₂O₂ accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. **Planta**, v. 223, n. 1, p. 57–68, 2005.

INOUE, M. H. et al., Lixiviação e degradação de Diuron em dois solos de textura contrastante. **Acta Sci., Agron. (Online)**, Maringá, v. 30, supl. spe, p. 631-638, 2008

ITURBE-ORMAETXE, I. et al. Oxidative Damage in Pea Plants Exposed to Water

- Deficit or Paraquat. **Plant Physiology**, v. 116, n. 1, p. 173–181, 2002.
- JIN, Y. et al. Diuron treatment reveals the different roles of two cyclic electron transfer pathways in photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 137, p. 15–20, 2017.
- JUNQUEIRA, N. E. G. et al. Anatomy and ultrastructure of embryonic leaves of the C 4 species *Setaria viridis*. n. June, p. 1163–1172, 2018.
- KALAJI, H. M. et al. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 4, 2016.
- KERSTIENS, G. Signalling across the divide: A wider perspective of cuticular structure-function relationships. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 4, p. 125–129, 1996.
- KIRKWOOD, R. C. **Target Sites for Herbicide Action**. Boston, MA: Springer US, 1991.
- LASCANO, R. et al. Paraquat: An Oxidative Stress Inducer. **Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds**, n. January, 2012.
- LEEGOOD, R. C. C 4 Plants. In: THOMAS, B.; MURRAY, B. G.; MURPHY, D. J. (Eds.). . **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**. Second Edition. Oxford: Elsevier, 2017. p. 52–59.
- LI, P.; BRUTNELL, T. P. *Setaria viridis* and *Setaria italica*, model genetic systems for the Panicoid grasses. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 9, p. 3031–3037, 2011.
- LI, J. et al. Paraquat Resistant1, a Golgi-localized putative transporter protein, is involved in intracellular transport of Paraquat. **Plant Physiol.** 162, 470–483, 2013.
- LICHTENTHALER, H.K. et al., Uptake of Diuron and concomitant loss of

photosynthetic activity in leaves as visualized by imaging the red chlorophyll fluorescence. **Photosynth Res.** 116: 355, 2013.

LIMA, D. A. DE et al. Morphoanatomical and physiological changes in *Bauhinia variegata* L. as indicators of herbicide Diuron action. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, n. November 2016, p. 242–250, jul. 2017.

LINDEMANN, I. DA S. et al. Foliar Desiccators Glyphosate, Carfentrazone, and Paraquat Affect the Technological and Chemical Properties of Cowpea Grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 32, p. 6771–6778, 16 ago. 2017.

MAGALHÃES, P. C. et al. EFEITO DE DOSES REDUZIDAS DE GLYPHOSATE E PARAQUAT SIMULANDO DERIVA NA CULTURA DO MILHO. **Planta Daninha**, v. 19, n. 2, p. 247–253, 2001.

MAGALHÃES, P. C.; SILVA, J. B.; DURÃES, F. O. M. Fitotoxicidade De Herbicidas Aplicados Em Pós-Emergência Na Fase. **Planta daninha**, v. 18, n. 2, p. 277–284, 2000.

MAJERAN, W. et al. Structural and metabolic transitions of C4 leaf development and differentiation defined by microscopy and quantitative proteomics in maize. **The Plant cell**, v. 22, n. 11, p. 3509–42, 2010.

MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S.; GUIMARÃES, T. G. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso**. Planantina, DF: Empraba Cerrados, 2008.

MARTINS, P. K. et al. *Setaria viridis* as a Model Plant for Functional Genomic Studies in C4 Crops BT - Transgenic Plants: Methods and Protocols. In: KUMAR, S.; BARONE, P.; SMITH, M. (Eds.). . New York, NY: Springer New York, 2019. p. 49–65.

MATTHES, B.; BÖGER, P. Chloroacetamides affect the plasma membrane. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 57, n. 9–10, p. 843–852,

2002.

MELHORANÇA, A. L. Tecnologia de Dessecação de Plantas Daninhas no Sistema Plantio Direto. **Circular técnica 10**, p. 6, 2002.

MENENDEZ, J.; ROJANO-DELGADO, M. A.; DE PRADO, R. Differences in herbicide uptake, translocation, and distribution as sources of herbicide resistance in weeds. **ACS Symposium Series**, v. 1171, p. 141–157, 2014.

MOSKOVA, I.; TODOROVA, D.; VERA ALEXIEVA, I. S. LEAF MORPHOLOGY AND HISTOLOGY CHANGES OF PEA PLANTS TREATED WITH. **Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences**, v. 64, n. March 2016, 2011.

MOUSTAKA, J.; MOUSTAKAS, M. Photoprotective mechanism of the non-target organism *Arabidopsis thaliana* to Paraquat exposure. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 111, n. 1, p. 1–6, 2014.

MUNEKAGE, Y.; SHIKANAI, T. Cyclic electron transport through photosystem I. **Plant Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 361–369, 2005.

MYUNG, W. et al. Paraquat prohibition and change in the suicide rate and methods in South Korea. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–10, 2015.

NAIN-PEREZ, A. et al. Tailoring Natural Abenquines to Inhibit the Photosynthetic Electron Transport through Interaction with the D1 Protein in Photosystem II. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 51, p. 11304–11311, 2017.

NAYLOR, R. E. L. **Weed Management Handbook Ninth Edition**. 9. ed. [s.l.] Blackwell Science, 2002.

NIYOGI, K. K.; BJORKMAN, O.; GROSSMAN, A. R. The roles of specific xanthophylls in photoprotection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.

94, n. 25, p. 14162–14167, 2002.

NOZAWA, Y.; NOGUCHI, T. PH-Dependent Regulation of the Relaxation Rate of the Radical Anion of the Secondary Quinone Electron Acceptor QB in Photosystem II As Revealed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Biochemistry**, v. 57, n. 19, p. 2828–2836, 2018.

OERKE, E.-C. CHAPTER 3 - Estimated crop losses due to pathogens, animal pests and weeds. In: OERKE, E.-C. et al. (Eds.). . **Crop Production and Crop Protection**. Amsterdam: Elsevier, 1999. p. 72–741.

OERKE, E. C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, v. 144, n. 1, p. 31–43, 2006.

OGLIARI, J. et al. MANEJO DE PLANTAS DANINHAS EM MARACUJAZEIRO AMARELO CULTIVADO COM ADUBAÇÃO QUÍMICA E ORGÂNICA. **Planta Daninha**, v. 25, n. 4, p. 823–830, 2007.

PAK, J.; SEO, B.; SONG, S. D. Ultrastructural Aspects of Kranz Anatomy in *Digitaria sanguinalis* and *Setaria viridis* (Poaceae). v. 40, n. 2, p. 102–109, 1997.

PAVANI, A. A. **Caracterização fisiológica de variedades de cana-de-açúcar submetidas ao estresse oxidativo causado pelo herbicida Paraquat**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 22 nov. 2013.

PIZZUTTI, I. R. et al. Determination of Paraquat and diquat: LC-MS method optimization and validation. **Food Chemistry**, v. 209, p. 248–255, 2016.

POWLES, S. B.; PRESTON, C. Herbicide cross resistance and multiple resistance in plants. **Herbicide Resistance Action Committee**, p. 1–19, 1995.

POWLES, S. B.; YU, Q. **Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides**. [s.l.: s.n.].

RIDLEY, S. M. Interaction of Chloroplasts with Inhibitors: Induction of Chlorosis by Diuron during Prolonged Illumination In vitro. **Plant Physiology**, v. 59, n. 4, p. 724–732, 1977.

ROLLAND, N. et al. The Chloroplast Envelope Proteome and Lipidome. In: Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. p. 1–48.

ROMAN, E. S. et al. **Como funcionam os herbicidas : da biologia à aplicação**. 21. ed. Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier, 2005.

ROTTET, S.; BESAGNI, C.; KESSLER, F. The role of plastoglobules in thylakoid lipid remodeling during plant development. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1847, n. 9, p. 889–899, 2015.

SAGE, R. F.; KHOSHRAVESH, R.; SAGE, T. L. From proto-Kranz to C4 Kranz: building the bridge to C4 photosynthesis. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 13, p. 3341–3356, 2014.

SAHA, P. et al. Effects of abiotic stress on physiological plasticity and water use of *Setaria viridis* (L.). **Plant Science**, v. 251, p. 128–138, 2016.

SANDELIUS, A. S.; ARONSSON, H. **The Chloroplast**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. v. 13

SANTIER, S.; CHAMEL, A. Reassessment of the role of cuticular waxes in the transfer of organic molecules through plant cuticles. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 225–231, 1998.

SARTORI, F.; VIDRIO, E. Environmental fate and ecotoxicology of Paraquat: a California perspective. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 2248, n. May, p.

1–39, 2018.

SCIFRES, C. J.; SANTELMANN, P. W. Response of Cotton and Sorghum to Post-Emergence Applications of Paraquat. **Weed Science Society of America**, v. 14, n. 1, p. 86–88, 1966.

SEBASTIAN, J. et al. Methods to promote germination of dormant *Setaria viridis* seeds. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–7, 2014.

SEDIGHEH, H. G. et al. Oxidative stress and leaf senescence. **BMC Research Notes**, v. 4, n. 1, p. 477, 2 dez. 2011.

SEPPÄNEN, M.; TURAKAINEN, M.; HARTIKAINEN, H. Selenium effects on oxidative stress in potato. **Plant Science**, v. 165, n. 2, p. 311–319, 2003.

SILVA, W. et al. Avaliação da eficiência de herbicidas no controle de plantas daninhas em alfafa. **Ciência agrotecnologia**, v. 28, n. 4, p. 729–253, 2004.

SINDIVEG. **O que você precisa saber sobre defensivos agrícolas**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://sindiveg.org.br/wp-content/uploads/2018/08/oquevoceprecisasabersobredefensivosagricolas.pdf>.

SOAR, C. J. et al., Reduced Paraquat translocation in Paraquat resistant *Arctotheca calendula* (L.) Levyns is a consequence of the primary resistance mechanism, not the cause. **Pest. Biochem. Physiol.** 76, 91–9, 2003.

SOOD, A.; PABBI, S.; UNİYAL, P. L. Effects of Paraquat on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in aquatic fern *Azolla microphylla*. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 58, n. 4, p. 667–673, 2011.

SOPHER, C. R. et al. Chloroplastic changes associated with paclobutrazol-induced stress protection in maize seedlings. **Canadian Journal of Botany**, v. 77, n. 2, p. 279–290,

1999.

SOUSA, C. DE P. **Action of herbicides on the photosynthetic activity of plants with C3 and C4 metabolism.** [s.l.] Universidade Federal de Pelotas, 2012.

SPURR, A. R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 26, n. 1–2, p. 31–43, 1969.

STACHOWSKI-HABERKORN, S. et al. Microalgal sensitivity varies between a Diuron-resistant strain and two wild strains when exposed to Diuron and irgarol, alone and in mixtures. **Chemosphere**, v. 151, p. 241–252, 2016.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, n. 6, p. 345–351, 2003.

STATA, M. et al. Mesophyll cells of C4 plants have fewer chloroplasts than those of closely related C3 plants. **Plant, cell & environment**, v. 37, n. 11, p. 2587–2600, 2014.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal.** 6^a ed. [s.l.] Artmed, 2017.

Technology Notes. **Weed Technology**, v. 12, n. 4, p. 789–790, 1998.

TURNER, B. P. E. T. The effects of post-emergence herbicide treatments on sugarcane in south africa. **Proceedings of The South African Sugar Technologists' Association**, p. 99–105, 1981.

UTRILLAS, M. J.; ALEGRE, L. Impact of Water Stress on Leaf Anatomy and Ultrastructure in *Cynodon dactylon* (L.) Pers. under Natural Conditions. **International Journal of Plant Sciences**, v. 158, n. 3, p. 313–324, maio 1997.

VAN ECK, J.; SWARTWOOD, K. *Agrobacterium* protocols: Third edition. In: **Agrobacterium Protocols. Methods in Molecular Biology.** [s.l.: s.n.]. v. 1p. 1–368.

VÁRADI, G. et al. Altered xanthophyll cycle and fluorescence quenching indicate light-dependent early events in Paraquat-treated resistant *Erigeron canadensis*. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 46, n. May 2014, p. 157–158, 2002.

VÁRADI, G.; DARKÓ, É.; LEHOCZKI, E. Changes in the Xanthophyll Cycle and Fluorescence Quenching Indicate Light-Dependent Early Events in the Action of Paraquat and the Mechanism of Resistance to Paraquat in *Erigeron canadensis* (L.) Cronq. **Plant Physiology**, v. 123, n. 4, p. 1459–1470, 2002.

VARGAS, L.; PEIXOTO, C. M.; ROMAN, E. S. **Manejo ne plantas daninhas na cultura de milho**. [s.l: s.n.].

VARGAS, L.; ROMAN, E. S. **Manejo e controle de plantas daninhas na cultura de soja**. Passo Fundo: [s.n.].

VOZNESENSKAYA, E. V. et al. Anatomy, chloroplast structure and compartmentation of enzymes relative to photosynthetic mechanisms in leaves and cotyledons of species in the tribe Salsoleae (Chenopodiaceae). **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n. 341, p. 1779–1795, 1999.

VOZNESENSKAYA, E. V et al. Kranz anatomy is not essential for terrestrial C₄ plant photosynthesis. **Nature**, v. 414, n. 6863, p. 543–546, 2001.

WANG, T. et al. A herbicide-resistant ACCase 1781 *Setaria* mutant shows higher fitness than wild type. **Heredity**, v. 105, n. 4, p. 394–400, 2010.

WISE, R. R. The Diversity of Plastid Form and Function. **The Structure and Function of Plastids**, p. 3–26, 2006.

XI, J. et al., Loss of AtPDR11, a plasma membranelocalized ABC transporter, confers Paraquat tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.** 69, 782–791, 2012.

XU, Z. Z.; ZHOU, G. S.; SHIMIZU, H. Effects of soil drought with nocturnal warming on leaf stomatal traits and mesophyll cell ultrastructure of a perennial grass. **Crop Science**, v. 49, n. 5, p. 1843–1851, 2009.

YILMAZ, G.; DANE, F. Phytotoxic effects of herbicide Attribut and surfactant BioPower on the root , stem , and leaf anatomy of *Triticum aestivum* ‘ Pehlivan ’. p. 886–893, 2013.

YUAN, X. et al. Safety of herbicide Sigma Broad on *Radix Isatidis* (*Isatis indigotica* Fort.) seedlings and their photosynthetic physiological responses. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 106, n. 1–2, p. 45–50, 2013.

ZER, H.; OHAD, I. Photoinactivation of Photosystem II Induces Changes in the Photochemical Reaction Center II Abolishing the Regulatory Role of the Qb Site in the D1 Protein Degradation. **European Journal of Biochemistry**, v. 231, n. 2, p. 448–453, 1995.