



Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG
Instituto de Ciências Agrárias - ICA



Mestrado em Produção Vegetal

**DERIVA DE GLYPHOSATE E CARFENTRAZONE-ETHYL
SOBRE A SEVERIDADE DA FERRUGEM (*Puccinia psidii*) EM
CLONES DE *Eucalyptus grandis***

SAMUEL ALVES DOS SANTOS

Montes Claros – MG

2016

SAMUEL ALVES DOS SANTOS

**DERIVA DE GLYPHOSATE E CARFENTRAZONE-ETHYL
SOBRE A SEVERIDADE DA FERRUGEM (*Puccinia psidii*) EM
CLONES DE *Eucalyptus grandis***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Vegetal, área de concentração em Produção Vegetal, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Produção Vegetal.

Área de concentração: Produção Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Leonardo David Tuffi Santos

Montes Claros – MG

2016

Santos, Samuel Alves.
S237d
2016 Deriva de glyphosate e carfentrazone-ethyl sobre a severidade da ferrugem (*Puccinia psidii*) em clones de *Eucalyptus grandis* / Samuel Alves dos Santos. Montes Claros, MG: Instituto de Ciências Agrárias/UFMG, 2016.
71 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo David Tuffi Santos.

Banca examinadora: Acelino Couto Alfenas, Fernando da Silva Rocha, Francisco André Ossamu Tanaka, Leonardo David Tuffi Santos.

Referências: f: 64-71.

1. Eucalipto. 2. Fisiologia. 3. Anatomia foliar. 4. Ultraestrutura foliar. 5. Patologia florestal. I. Santos, Leonardo David Tuffi. II. Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais. III. Título.

CDU: 630

SAMUEL ALVES DOS SANTOS

DERIVA DE GLYPHOSATE E CARFENTRAZONE-ETHYL SOBRE A
SEVERIDADE DA FERRUGEM (*Puccinia psidii*) EM CLONES DE *Eucalyptus*
grandis

Prof. Dr. Leonardo David Tuffi Santos
(Orientador - UFMG/ICA)

Aprovada em 22 de fevereiro de 2016.

Montes Claros - MG

2016

DEDICO

Aos meus pais,

“por me ensinarem que o respeito, a honestidade e humildade são as maiores virtudes de um homem. E que as maiores riquezas quase sempre estão na simplicidade das coisas”.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre ouvir minhas orações e atender meus pedidos.

À minha família e minha namorada Najara que, com muito apoio e carinho, não mediram esforços para a conclusão desta etapa.

Ao meu orientador, o Prof. Leonardo David Tuffi Santos, pelo compromisso, confiança e dedicação.

Aos meus coorientadores Prof. Acelino Couto Alfenas (UFV), Prof. Francisco André Ossamu Tanaka (ESALQ/USP) e Prof. Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos (UFPR) pela parceria e pela valorosa contribuição.

Ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Produção Vegetal, berço da minha formação.

À Clonar Resistência a Doenças Florestais LTDA, pela disponibilização das mudas clonais.

Ao Departamento de Fitopatologia da UFV por ceder infraestrutura necessária à realização dos experimentos.

À toda equipe do Laboratório de Patologia Florestal Molecular da UFV, em especial à Michele pelo auxílio na condução dos experimentos.

A Autieres Faria pela contribuição durante as aplicações dos herbicidas.

A Gilmar do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, pelo fornecimento da solução de Karnovsky.

Ao Prof. Júlio César pelo empréstimo do Analisador portátil de fotossíntese LI-COR 6400XT e ao Eduardo Medina pelo auxílio durante as avaliações fisiológicas.

Ao Núcleo de Apoio a Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada na Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz” (ESALQ/USP), pelo suporte durante o processamento e análise das amostras em anatomia e ultraestrutura.

Aos membros do GPPLAN (Grupo de Pesquisa em Plantas Daninhas), pelo apoio e contribuição.

Aos meus amigos da república Monastério: Mathias, Demerson, Gabriel e Ronie, pelo convívio e amizade.

À coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado e auxílio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo aporte financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo aporte financeiro.

RESUMO

A ação de herbicidas pode alterar a severidade da ferrugem (*Puccinia psidii*) do eucalipto. Este trabalho teve como objetivos: (i) avaliar a tolerância dos clones de eucalipto aos herbicidas carfentrazone-ethyl e glyphosate; (ii) avaliar a severidade da ferrugem; (iii) avaliar os efeitos dos herbicidas na anatomia e ultraestrutura foliar e na fisiologia dos clones; e (iv) avaliar a histopatologia da interação patógeno-hospedeiro. Para instalação dos experimentos, foram utilizados dois clones de *Eucalyptus grandis*, sendo um resistente (G-21), e outro suscetível (G-33) a *P. psidii*. As subdoses herbicidas testadas foram testemunha, 86.4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate, 3.0 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl e a mistura de 86.4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3.0 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl. Dois dias após a aplicação (DAA) dos herbicidas, foi realizada a inoculação do patógeno. Para análises anatômicas e ultraestruturais, foram coletadas amostras foliares nos tempos zero, 6, 12 e 21 dias após a inoculação (DAI). A taxa fotossintética, a condutância estomática e o rendimento efetivo do fotossistema II foram avaliados aos 4 e 23 DAA. A tolerância dos clones aos herbicidas e a severidade da ferrugem foram avaliadas ao final dos experimentos com 23 DAA e 21 DAI, respectivamente. Plantas dos dois clones apresentaram alterações na anatomia foliar como erosão de ceras epicuticulares, degeneração de células epidérmicas e parenquimáticas, sobretudo quando expostas à aplicação de carfentrazone-ethyl e mistura. Plantas expostas à aplicação herbicida apresentaram acúmulo de grãos de amido nos cloroplastos. O clone G-33 foi o mais afetado e apresentou maior fitointoxicação, menor crescimento, menor produção de massa seca e maior redução dos parâmetros fisiológicos quando tratado com a mistura herbicida, seguida das subdoses isoladas de carfentrazone-ethyl e glyphosate, respectivamente. O crescimento, o desenvolvimento e os parâmetros fisiológicos do clone G-21 não foram afetados pela subdose isolada de carfentrazone-ethyl. A manifestação da doença ocorreu apenas no clone suscetível a *P. psidii*. Plantas do clone G-33, expostas aos herbicidas, apresentaram menor severidade da ferrugem. Aos 6 DAI, plantas desse clone expostas à aplicação dos herbicidas

apresentaram abaixo do ponto de infecção camadas de células parenquimáticas em intensa divisão celular, além de uma “pré-pústula” com desenvolvimento reduzido em relação às plantas testemunha. Aos 12 DAI, as pústulas estavam totalmente formadas e com grande produção de urediniósporos nas plantas testemunha. Entretanto, as plantas expostas à aplicação apresentaram, abaixo do ponto infecção, tecido de compartimentalização estratificado entre duas a quatro camadas, limitando a área colonizada pelo fungo, além de pústulas sem produção de esporos ou com produção reduzida. A fitointoxicação e a redução na taxa fotossintética, decorrentes da ação dos herbicidas, estão correlacionadas com a redução da severidade da doença no clone G-33. Conclui-se que o clone G-33 é mais sensível aos herbicidas testados. E que a deriva dos herbicidas glyphosate e carfentrazone-ethyl, aplicados de forma isolada ou em mistura, não altera o nível de resistência do clone resistente a *P. psidii* (G-21), no entanto, reduz a severidade da ferrugem do eucalipto nas plantas do clone suscetível (G-33), sobretudo quando usados em mistura.

Palavras-chave: Eucalipto. Fisiologia. Anatomia foliar. Ultraestrutura foliar. Patologia florestal.

ABSTRACT

The action of herbicides could affect the severity level of rust (*Puccinia psidii*) of eucalyptus. The present study aimed to: (i) assess the tolerance of the eucalyptus clones to carfentrazone-ethyl and glyphosate; (ii) assess the severity of rust; (iii) evaluate the effects of the herbicides in anatomy and leaf ultrastructure and physiology of clones; and (iv) evaluate the histopathology of host-pathogen interaction. For installation the experiments were used two *Eucalyptus grandis* clones, one resistant (G-21), and other susceptible (G-33) to fungus *P. psidii*. The herbicides doses tested were zero, 86.4 g a.e. ha⁻¹ of glyphosate, 3.0 g a.e. ha⁻¹ of carfentrazone-ethyl and mixture (86.4 g a.e. ha⁻¹ of glyphosate + 3.0 g a.e. ha⁻¹ of carfentrazone-ethyl). Two days after application (DAA) of herbicides, was performed the inoculation of the pathogen. For anatomical and ultrastructural analysis, leaf samples were collected at: zero; 6; 24: 21 days after inoculation (DAI). The photosynthetic rate, stomatal conductance and the effective yield of photosystem II were evaluated at 4 and 23 DAA. The tolerance of the eucalyptus clones to herbicides and rust severity were assessed at the end of the experiments (23 DAA and DAI 21, respectively). Plants of the two clones showed changes in leaf anatomy, as erosion of epicuticular waxes, degeneration of epidermal cells and parenchyma, especially when exposed to application of carfentrazone-ethyl and mixture. In addition, plants exposed to herbicide application showed an accumulation of starch granules in the chloroplasts. The G-33 clone was the most affected, with higher phytotoxicity, lower growth, lower dry matter production and greater reduction of physiological parameters, when treated with the herbicide mixture, followed by single doses of carfentrazone-ethyl and glyphosate, respectively. The growth, development and physiological parameters of the G-21 clone were not affected by the single dose of carfentrazone-ethyl. The disease occurred only in clone susceptible to *P. psidii*. The plants of G-33 clone, exposed to herbicides had lower disease severity. At 6 DAI, plants of this clone, that were exposed to herbicide application, showed below the point of infection, layers of parenchyma cells with intensive cell division, plus a "pre-pustule" with

reduced development when it compared to the control plants. At 12 DAI, the pustules were fully formed and with great production of urediniospores in control plants. However, plants exposed to the herbicides application presented, below the point of infection, compartmentalization fabric with two until four layers, limiting the area colonized by the fungus, and pustules with no or reduced production of spores. The phytointoxication and the reduction in photosynthetic rate, due to herbicide action, are correlated with the decrease on severity of rust in the G-33 clone. In summary, it is concluded that G-33 clone is more sensitive to herbicides. And that the drift of the herbicides (glyphosate and carfentrazone-ethyl), applied alone or in mixture, does not alter the level of resistant of the G-21 clone. However, reducing the rust severity of de Eucalyptus in the plants of the susceptible clone (G-33), especially when used in mixture.

Keywords: Eucalyptus. Physiology, Leaf anatomy, Leaf ultrastructure, Forest pathology.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- DAT** - Dias após transplântio
- NPK** - Nitrogênio; fósforo; potássio
- MSPA** - Massa seca da parte aérea
- DAA** - Dias após aplicação
- DAI** - Dias após inoculação
- IMc** - Índice de McKinney
- lafi** - Índice de área foliar infectada
- NMUP** - Número médio de urediniosporos produzidos
- MIP** - Manejo Integrado de Pragas
- MEV** - Microscopia eletrônica de varredura
- MET** - Microscopia eletrônica de transmissão
- Ep** - Epiderme
- PP** - Parênquima paliádico
- Es** - Estômato
- Ct** - Cutícula
- Ti** - Tilacóide
- Cl** - Cloroplasto
- Pr** - Peroxissomo
- GA** - Grão de amido
- TF** - Taxa fotossintética líquida
- CE** - Condutância estomática
- Hi** - Hifas fúngicas
- Ur** - Urediniosporos
- µm** - Micrômetros
- nm** - Nanômetros

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Ação herbicida indireta sobre os mecanismos de defesa estruturais de plantas aos patógenos (B-E) e direta sobre a germinação de esporos ou crescimento de hifas (F-G). **A.** Hospedeiro sem mecanismos de defesa; Esporos (Es) germinam e hifas (Hi) penetram de forma direta através de apressórios (Ap) ou por aberturas naturais. **B.** Na presença de tricomas (Tr) os esporos germinam, mas não atingem a epiderme. **C.** Cutícula espessa (Ct) e ceras epicuticulares (CE) formam barreiras à penetração. **D.** Efeito dos herbicidas sobre os tricomas favorece a penetração. **E.** Degeneração das ceras epicuticulares e cutícula, facilitando a penetração. **F e G.** Moléculas herbicidas (MH) inibem a germinação de esporos..... 30
- Figura 2 -** Efeito da deriva dos herbicidas em folhas da parte basal da copa, exposta à aplicação, de clones de *Eucalyptus grandis* 24 horas após aplicação. **A, B, E e F.** Folhas sem presença de sintomas de intoxicação. **C, D, G e H.** Folhas com sintomas de intoxicação. Setas indicam pontos necróticos causados pelo carfentrazone-ethyl. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl. Barras = 1cm..... 38
- Figura 3 -** Efeito da deriva dos herbicidas em folhas da parte apical da copa, protegida da aplicação, de clones de *Eucalyptus grandis* 10 dias após aplicação. **A, E e G.** Folhas sem presença de sintomas de intoxicação. **B, C, D, F, G e H.** Folhas com sintomas de intoxicação com clorose na borda e ápice foliar. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-

- ethyl. Barras = 1cm..... 39
- Figura 4 -** Efeito da deriva dos herbicidas em folhas da parte apical da copa, protegida da aplicação, de clones de *Eucalyptus grandis* 23 dias após aplicação. **A, E e G.** Folhas sem presença de sintomas de intoxicação. **B, C, D, G e H.** Folhas com sintomas de intoxicação com clorose distribuída por todo limbo foliar. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl. Barras = 1cm..... 40
- Figura 5 -** Microscopia eletrônica de varredura. Efeito da deriva dos herbicidas na face abaxial de folhas da parte basal da copa, exposta à aplicação, em clones de *Eucalyptus grandis* 2 dias após aplicação. **A-B.** Células do complexo estomático com turgor e ceras epicuticulares com conformação característica a espécie. **C-H.** Ceras epicuticulares erodidas (asteriscos). **E e G.** Degeneração de parede, seta indica ruptura da cutícula (Ct) nas células guardas do complexo estomático. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl. Barras = 25 µm..... 42
- Figura 6 -** Microscopia eletrônica de varredura. Efeito da deriva dos herbicidas na face adaxial de folhas da parte basal da copa, exposta à aplicação, em clones de *Eucalyptus grandis* 2 dias após aplicação. **A-B.** Células epidérmicas com turgor e ceras epicuticulares com conformação característica à espécie. **C-H.** Ceras epicuticulares erodidas (asteriscos). Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl. Barras = 25 µm..... 43
- Figura 7 -** Microscopia de luz. Efeito da deriva dos herbicidas em folhas da parte basal da copa, exposta à aplicação, de

clones de *Eucalyptus grandis* 2 dias após aplicação.

A-D. Células com conformação e turgor característico à espécie. **E-H.** Células epidérmicas degradadas (asteriscos); células parenquimáticas com perda de turgor (setas). Abreviações: Ep – epiderme; PP – parênquima paliçádico; PL – parênquima lacunoso; Es – estômato. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl. Barras = 25 µm.....

44

Figura 8 -

Microscopia eletrônica de transmissão. Efeito da deriva dos herbicidas em folhas da parte apical da copa, protegida da aplicação, de clones de *Eucalyptus grandis* 14 dias após aplicação. **A.** Cloroplasto de uma folha sadia (planta testemunha) com os tilacóides (Ti) perfeitamente organizados em granum. **B.** Cloroplasto (Cl) de uma folha clorótica (planta exposta à deriva dos herbicidas) com tilacóides totalmente desorganizados. **C.** Célula de folha oriunda de uma planta testemunha. Nas amostras analisadas não foram observadas presença de peroxissomos. **D.** Célula de planta exposta à deriva de carfentrazone-ethyl com presença de peroxissomos (Pr); detalhe evidenciando tal organela. Barras = 1 µm.....

46

Figura 9 -

Microscopia eletrônica de transmissão. Acúmulo de grãos de amido nos cloroplastos de folhas da parte apical da copa, protegida da aplicação, de *Eucalyptus grandis* 14 dias após aplicação. **A-B.** Cloroplastos sem grão de amido. **C-H.** Cloroplastos com presença de grãos de amido (setas). Abreviações: Cl – cloroplasto; GA – grão de amido. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl. Barras = 1 µm.....

47

- Figura 10** - Rendimento efetivo do FS II (A), Taxa fotossintética líquida (B) e Condutância estomática (C) 4 dias após aplicação dos herbicidas. Letras minúsculas comparam as médias dentro de um mesmo clone, enquanto que as maiúsculas dentro do mesmo tratamento herbicida. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Barras = erro padrão da média. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl..... 48
- Figura 11** - Rendimento efetivo do FS II (A), taxa fotossintética líquida (B) e condutância estomática (C) 23 dias após aplicação dos herbicidas. Letras minúsculas comparam as médias dentro de um mesmo clone, enquanto que as maiúsculas dentro do mesmo tratamento herbicida. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Barras = erro padrão da média. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl..... 49
- Figura 12** - Fitointoxicação (A), altura total (B) e massa seca da parte aérea (C) 23 dias após aplicação dos herbicidas. Letras minúsculas comparam as médias dentro de um mesmo clone, enquanto que as maiúsculas dentro do mesmo tratamento herbicida. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras = erro padrão da média. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl..... 53
- Figura 13** - Espectro de infecção de *Puccinia psidii* na face abaxial das folhas de clones de *Eucalyptus grandis* 21 dias após inoculação. **A.** Pústulas bem formadas com

grande produção de esporos. **B-D.** Folhas de plantas expostas aos herbicidas: detalhe evidencia pústulas com pontos secos, aparentemente com produção reduzida de urediniósporos. **E-H.** Folhas do clone resistente sem presença de infecção. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl..... 55

Figura 14 - Severidade da ferrugem no Clone G-33, suscetível a *Puccinia psidii*. **A.** Índice de McKinney. **B.** Índice médio de área foliar infectada. **C.** Número médio de urediniósporos. Médias justapostas seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras = erro padrão da média. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl..... 56

Figura 15 - Microscopias de luz e eletrônica de varredura. Efeito da deriva dos herbicidas na formação das pústulas 6 dias após a inoculação de *Puccinia psidii* em plantas do clone G-33. **A-B.** Pré-pústulas grandes. **C, E e G.** *Ocorrência de divisão celular na região abaixo da infecção (asteriscos). **D e F.** Pré-pústula com desenvolvimento reduzido. **H.** Pré-pústula má-formada (sem produção de esporos). Abreviações: Ep - epiderme; PP - parênquima paliçádico; Hi - hifas. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl. Barras = 50 µm..... 58

Figura 16 - Microscopias de luz e eletrônica de varredura. Efeito da deriva dos herbicidas nas pústulas 12 dias após a inoculação de *Puccinia psidii* em plantas do clone G-33. **A-B.** Pústulas com alta produção de urediniósporos (Ur). **C e E.** Tecido de compartimentalização (Tc) com duas camadas de

células. **D e F.** Pústulas com produção reduzida de esporos. **G.** Tecido de compartimentalização com três camadas. **H.** Pústula seca (sem produção de urediniosporos). Abreviações: Ep - epiderme; PP - parênquima paliçádico; Hi - hifas. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl. Barras = 50 µm..... 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análise de correlação entre as variáveis estudadas para determinar a tolerância dos clones aos herbicidas.....	52
Tabela 2 -	Análise de correlação entre as variáveis estudadas para determinar a tolerância aos herbicidas e as variáveis características da severidade da ferrugem do eucalipto.....	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
2.1. Importância dos herbicidas glyphosate e carfentrazone-ethyl em florestas de eucalipto.....	22
2.2. Efeitos da deriva de herbicidas em culturas.....	23
2.3. Ferrugem do eucalipto: importância e ciclo de relações patógeno-hospedeiro.....	24
2.4. Mecanismos de defesa das plantas aos patógenos.....	26
2.5. Herbicidas X doenças de plantas.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1. Obtenção das mudas.....	31
3.2. Instalação dos experimentos.....	31
3.3. Aplicação dos herbicidas.....	32
3.4. Inoculação do patógeno.....	32
3.5. Avaliação da tolerância dos clones aos herbicidas.....	33
3.6. Avaliação da severidade da ferrugem.....	33
3.7. Análises fisiológicas.....	34
3.8. Anatomia e ultraestrutura foliar.....	35
3.9. Análise estatística.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. Tolerância dos clones aos herbicidas.....	37
4.1.1. Efeitos dos herbicidas na morfologia, anatomia e ultraestrutura foliar e na fisiologia das plantas.....	37
4.1.2. Fitointoxicação, altura total e massa seca da parte aérea.....	51
4.2. Severidade da ferrugem e histopatologia da interação <i>Puccinia psidii</i> X <i>Eucalyptus grandis</i>	54
5. CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

O uso de herbicidas para controle de plantas daninhas em plantios de eucalipto tem levantado questionamentos sobre impactos negativos ao ambiente e à cultura. Dentre eles, está a alteração no nível de severidade da ferrugem do eucalipto causada pelo fungo *Puccinia psidii* (TUFFI-SANTOS *et al.*, 2007; TUFFI-SANTOS *et al.*, 2011).

Dentre os cinco herbicidas registrados para uso em eucalipto no Brasil (AGROFIT, 2016), o glyphosate é o mais utilizado, principalmente pelo seu amplo espectro de ação e baixo custo. Em razão principalmente da pressão de seleção, em áreas com aplicação constantes de glyphosate existem diversos relatos de plantas daninhas resistentes à molécula (NEVE *et al.*, 2003; VARGAS *et al.*, 2007; DUKE; POWLES, 2008; POWLES, 2008; BECKIE, 2011; NORSWORTHY *et al.*, 2011; GREEN, 2012; SHANER *et al.*, 2012). Por apresentar eficiência desejável sobre plantas daninhas resistentes ao glyphosate, como *Commelina* ssp. (WERLANG; SILVA, 2002), o herbicida carfentrazone-ethyl tem sido bastante utilizado como alternativa ou em mistura ao glyphosate. Outro fato importante é que dentre os herbicidas registrados para a cultura, apenas o glyphosate e o carfentrazone-ethyl são aceitos pelas certificadoras para ser utilizado em florestas de eucalipto (FSC, 2015).

Glyphosate e carfentrazone-ethyl são herbicidas não seletivos ao eucalipto, por isso as aplicações devem ser realizadas de forma dirigida sobre as plantas daninhas, evitando o contato indesejado com a cultura (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011). Mesmo tomando esse cuidado, durante as aplicações parte do produto pode sofrer arraste pelo vento e atingir as plantas de eucalipto por deriva (TUFFI-SANTOS *et al.*, 2006). Quando isso ocorre, as plantas de eucalipto podem apresentar murcha, clorose e necrose nas folhas (TUFFI-SANTOS *et al.*, 2006), o que pode afetar o crescimento e desenvolvimento da floresta.

O Manejo Integrado de Pragas (MIP) consiste na gestão de técnicas de manejo de plantas daninhas, insetos, patógenos, nematoides, artrópodes e vertebrados bem como de suas interações (SANYAL; SHRESTHA, 2008). Nessa concepção, o estudo da influência da deriva de herbicidas sobre a severidade de doenças é de extrema importância, pois, a época em que são intensificadas as aplicações herbicidas para manejo de plantas daninhas coincide com a fase em que o eucalipto apresenta condições favoráveis à ocorrência da ferrugem em campo. A ferrugem do eucalipto afeta preferencialmente tecidos jovens e brotações (ALFENAS *et al.*, 2009). Apesar de ser doença comum em viveiros, jardins e minijardins clonais, a ferrugem pode ser problema em plantas no campo de até dois anos de idade (ZAUZA *et al.*, 2008), já que, logo após o plantio, as plantas encontram-se em grande crescimento vegetativo com grande quantidade de tecidos tenros.

Embora existam trabalhos que constatarem que a deriva do herbicida glyphosate reduz a severidade da ferrugem em mudas de eucalipto (TUFFI-SANTOS *et al.*, 2007; TUFFI-SANTOS *et al.*, 2011), ainda não é bem esclarecido como os efeitos da deriva de herbicidas sobre plantas de eucalipto contribuem para a redução da severidade da ferrugem. Nesse contexto, objetivou-se com o presente trabalho: (i) avaliar a tolerância de dois clones de *Eucalyptus grandis* aos herbicidas carfentrazone-ethyl e glyphosate; (ii) avaliar a severidade da ferrugem em plantas previamente expostas à deriva desses herbicidas; (iii) avaliar as alterações causadas pela deriva na anatomia e ultraestrutura foliar e na fisiologia das mudas de eucalipto; e (iv) analisar em microscopia de luz e eletrônica de varredura e de transmissão a histopatologia da interação patógeno-hospedeiro.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Importância dos herbicidas glyphosate e carfentrazone-ethyl em florestas de eucalipto

O manejo de plantas daninhas representa uma das práticas mais importantes no cultivo do eucalipto. Sem controle, a interferência das plantas daninhas pode acarretar perdas de até 40% na produtividade da floresta (TAROUCO *et al.*, 2009). No caso das empresas florestais, que geralmente cultivam extensas áreas, a escassez de mão de obra, associada à necessidade de atingir elevados índices de produtividade com menor custo de produção, tem levado ao aumento no uso de herbicidas para controle de plantas daninhas.

O glyphosate é o principal herbicida utilizado na eucaliptocultura, pelo seu baixo custo e amplo espectro de ação. O ambiente aliado ao uso frequente do mesmo herbicida pode favorecer a seleção de indivíduos tolerantes e/ou resistentes a um ou mais mecanismos de ação herbicida (HANSON *et al.*, 2013). Em áreas com uso constante de glyphosate, existem diversos relatos de plantas resistentes à molécula desse herbicida (NEVE *et al.*, 2003; VARGAS *et al.*, 2007; DUKE; POWLES, 2008; POWLES, 2008; BECKIE, 2011; NORSWORTHY *et al.*, 2011; GREEN, 2012; SHANER *et al.*, 2012). Assim, a mistura de herbicidas com mecanismos de ação distintos, mas com efeito sinérgico, aumenta o espectro de ação e melhora consideravelmente a eficiência de controle (KUMAR; JHA, 2015; McCULLOUGH *et al.*, 2015; WALSH *et al.*, 2015; WALSH *et al.*, 2014).

O herbicida carfentrazone-ethyl possui boa eficiência sobre plantas daninhas tolerantes ao glyphosate como trapoerabas (*Commelina* sp.) (WERLANG; SILVA, 2002). Dentre os produtos registrados para uso em eucalipto (AGROFIT, 2016), além do glyphosate, apenas o herbicida carfentrazone-ethyl é permitido pelas certificadoras para ser utilizado (FSC, 2015). A certificação florestal é de grande importância, pois, produtos oriundos de florestas certificadas apresentam maior valor agregado. Dessa

forma, esse herbicida tem sido testado e bastante utilizado em plantios comerciais de eucalipto, tanto em aplicações isoladas ou em mistura ao herbicida glyphosate, já que os dois herbicidas apresentam efeito sinérgico (WERLANG; SILVA, 2002).

Glyphosate e carfentrazone-ethyl são herbicidas não seletivos ao eucalipto, por isso as aplicações devem ser realizadas de forma dirigida sobre as plantas daninhas, evitando o contato indesejado com a cultura (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011). Mesmo tomando esse cuidado, parte do produto pode sofrer arraste pelo vento durante as aplicações, fenômeno conhecido por deriva, ou mesmo de forma direta atingir as plantas de eucalipto (TUFFI-SANTOS *et al.*, 2006).

2.2. Efeitos da deriva de herbicidas em culturas

Herbicidas não seletivos apresentam efeito tóxico quando em contato com as culturas. Portanto, ao utilizar esses herbicidas, as aplicações devem ser realizadas de forma dirigida sobre as plantas daninhas, evitando o contato indesejado com plantas da cultura. Ainda que seja tomada essa precaução, parte do produto pode sofrer arraste pelo vento e atingir as culturas por deriva (SILVA; SILVA, 2012).

Os efeitos negativos da deriva de herbicidas em culturas são comprovados por diversos estudos (YAMASHITA; GUIMARÃES, 2005; TUFFI-SANTOS *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2012). No Eucalipto, por exemplo, a intoxicação é caracterizada pela presença de folhas cloróticas, podendo, em alguns casos, evoluir para necrose, redução no crescimento e morte da planta (TUFFI-SANTOS *et al.*, 2006).

Herbicidas, em geral, afetam a fisiologia e o metabolismo das plantas. Plantas expostas a aplicações de glyphosate apresentam redução na produção de açúcares, aminoácidos e proteínas (MACHADO *et al.*, 2010; LANGARO *et al.*, 2014; VARGAS *et al.*, 2014), e na taxa respiratória (HECKMAN *et al.*, 2002; DING *et al.*, 2011). Por essa razão, a ação herbicida

afeta o crescimento e desenvolvimento das plantas, o que limita o incremento de matéria seca na parte aérea (GUSMÃO *et al.*, 2011; FRANÇA *et al.*, 2010; TIBURCIO *et al.*, 2012).

O efeito de adjuvantes presentes na formulação comercial dos herbicidas pode provocar degeneração de tricomas, da cutícula e erosão das ceras epicuticulares (TUFFI-SANTOS *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2015), afetando as barreiras naturais das plantas à penetração de patógenos. Adicionalmente, herbicidas podem alterar a síntese de produtos oriundos do metabolismo secundário como as fitoalexinas, que são compostos com propriedades antimicrobianas (RIZZARDI *et al.*, 2003), bem como aumentar a atividade de enzimas ligadas aos mecanismos de defesa das plantas (PEREIRA *et al.*, 2009). O que pode interferir de forma positiva ou negativa na severidade de doenças.

2.3. Ferrugem do eucalipto: importância e ciclo de relações patógeno-hospedeiro

O fungo *Puccinia psidii* Winter, agente causal da ferrugem do eucalipto, está amplamente distribuído pela América do Sul e Central (GLEN *et al.*, 2007) e encontra-se em ampla dispersão mundial, com relatos no Japão (KAWANISHI *et al.*, 2009), China (ZHUANG; WEI, 2011), Austrália (CARNEGIE; LIDBETTER, 2012) e nos EUA, mais precisamente nos estados da Flórida, Califórnia e Havaí (MELLANO, 2006; UCHIDA *et al.*, 2006). Recentemente, foi relatada sua ocorrência na Indonésia (McTAGGART *et al.*, 2016). No Brasil, o primeiro relato do fungo em eucalipto foi em 1944, em mudas de *Corymbia citriodora* no Rio de Janeiro (JOFFILY, 1944). Além do eucalipto, *P. psidii* afeta diversas espécies de plantas da família Myrtaceae (CARNEGIE; LIDBETTER, 2012).

Em condições de ambiente favorável, *P. psidii* infecta preferencialmente tecidos tenros como folhas, botões florais, frutos e ramos (ALFENAS *et al.*, 2009). Por isso, a doença é mais observada em cepas, minicepas e em mudas de eucalipto. Em campo, a doença pode ser problema

em plantas com até dois anos de idade (ZAUZA *et al.*, 2008). Em genótipos altamente suscetíveis pode causar ainda deformações, necroses, hipertrofia, minicancros e morte das porções terminais de crescimento (ALFENAS *et al.*, 2009).

Embora existam fungicidas registrados para uso na cultura do eucalipto, a estratégia mais eficiente e econômica para o manejo da doença consiste no uso de genótipos resistentes. Manter a doença abaixo do nível de dano econômico é importante, já que, sem adoção de medidas de controle, as perdas de produtividade são consideráveis.

P. psidii é um fungo biotrófico, assim necessita de tecidos hospedeiro vivos para infectar e colonizar. Sua sobrevivência é baseada em estruturas denominadas urediniósporos, que quando depositados sobre a superfície foliar do hospedeiro, em condições de umidade favorável, germinam e penetram de forma direta através da formação de apressório (XAVIER *et al.*, 2015).

A formação da hifa primária é observada entre 12 e 18 horas após a inoculação. A partir dessa hifa primária formam-se, dentro das células do hospedeiro, os haustórios, que são estruturas ramificadas que servem para o patógeno nutrir-se de substâncias oriundas do metabolismo celular do hospedeiro (XAVIER *et al.*, 2001).

Em hospedeiros suscetíveis, a partir de três dias após a inoculação (DAI), ocorre ramificação das hifas fúngicas, a fim de colonizar os tecidos hospedeiros. Aos 6 DAI, é possível observar hipertrofia dos tecidos colonizados (XAVIER *et al.*, 2001). A formação das pústulas, sintoma mais característico da doença, ocorre a partir exposição da massa de urediniósporos aos 9 DAI (XAVIER *et al.*, 2001). Visualmente, essa massa de esporos apresenta coloração ferrugínea/amarelada (ALFENAS *et al.*, 2009).

A relação entre patógeno-hospedeiro é muito íntima e equivalente a uma batalha em que os envolvidos desenvolveram uma série de mecanismos de ataque e defesa, respectivamente (AMORIM; PASCHOLATI, 2011).

2.4. Mecanismos de defesa das plantas aos patógenos

Após contato com a superfície das plantas, o patógeno infecta e coloniza os tecidos hospedeiros, enquanto que esses também utilizam de mecanismos para se defender da infecção (AMORIM; PASCHOLATI, 2011). Os mecanismos de defesa das plantas aos agentes patogênicos são classificados como estruturais e bioquímicos. Dentre os diversos mecanismos de defesa, existem aqueles que já estavam presentes nas plantas antes do contato com o patógeno e outros que são estimulados em resposta à infecção. Quando já presentes nos tecidos hospedeiros, antes da infecção, dizemos que fazem parte dos mecanismos pré-formados. Já quando são produzidos em resposta à infecção, são chamados de pós-formados (STANGARLIN *et al.*, 2011).

A superfície foliar é o primeiro obstáculo encontrado pelos patógenos. Folhas com grande quantidade de tricomas podem envolver esporos fúngicos e impedir que, mesmo após germinação, não consigam atingir as demais células epidérmicas e penetrar no hospedeiro. Plantas de feijoeiro com maior densidade de tricomas apresentaram maior tolerância à antracnose (JERBA *et al.*, 2005). Após os tricomas, a presença de cutícula mais espessa associada à deposição de ceras epicuticulares, sobretudo na região da cavidade estomática, são barreiras importantíssimas à penetração (REINA-PINTO; YEPHREMOV, 2009). Os estômatos são a principal via de penetração por aberturas naturais (AMORIM; PASCHOLATI, 2011). Nesse sentido, a densidade estomática pode ser outro mecanismo importante de defesa das plantas contra a penetração (PAZ-LIMA *et al.*, 2010).

Como resposta à infecção, destacam-se a formação de halos, papilas, zonas de lignificação ou de abscisão e tilose (AMORIM; PASCHOLATI, 2011). As papilas são projeções das células epidérmicas com intuito de aumentar o espaço entre a parede celular e a membrana no exato local onde o patógeno exerce pressão para penetração (STANGARLIN *et al.*, 2011). A

resistência a *Fusarium culmorum* em trigo está associada à formação de papilas (KANG; BUCHENAUER, 2000). Zonas de suberização ou camadas de abscisão são fundamentais para evitar a progressão da doença. Após a infecção, a zona de suberização isola o patógeno em determinada área já contaminada do hospedeiro e dificulta o fluxo de água e nutrientes do hospedeiro para o fungo e o trânsito de toxinas e enzimas do patógeno para o hospedeiro (STANGARLIN *et al.*, 2011).

Na relação patógeno-hospedeiro, os mecanismos bioquímicos produzidos pelas plantas são mais versáteis. Dentre as substâncias pré-formadas, têm-se: ácido clorogênico, ácido protocatecóico e catecol, α -tomatina, avenacinas, tuliposídeos, glicosídeos fenólicos, inibidores protéicos e enzimas de defesa vegetal. Em meio aos compostos de defesa formados após a infecção, podemos citar as espécies reativas de oxigênio, o óxido nitroso e as fitoalexinas (STANGARLIN *et al.*, 2011). Oriundas do metabolismo secundário, as fitoalexinas possuem propriedades antimicrobianas e são produzidos pelas plantas em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos (AMORIM; PASCHOLATI, 2011; STANGARLIN *et al.*, 2011).

2.5. Herbicidas X doenças de plantas

Os herbicidas podem interferir direta ou indiretamente sobre os mecanismos de defesa das plantas aos patógenos (FIGURA 1d-e), como também diretamente sobre a germinação e o crescimento de fungos fitopatogênicos (FIGURA 1f-g). Em ambos os casos, podem afetar de forma positiva ou negativa a severidade de doenças em culturas.

Os efeitos de adjuvantes sobre os mecanismos de defesa estruturais pré-formados podem favorecer a penetração dos patógenos ao hospedeiro. Ao promover perda de turgor e degeneração dos tricomas, o espaço entre o esporo fúngico e a superfície foliar é reduzido, o que possibilita que, após a germinação, as hifas fúngicas penetrem no hospedeiro (FIGURA 1d). Além disso, a erosão da cutícula e de ceras epicuticulares, decorrente do efeito

adjuvante, facilita a penetração (FIGURA 1e). Pulverizações em folhas de *Brassica napus* com os herbicidas dalapon, carbetamida e propizamida reduziram a quantidade e alteraram a forma das ceras epicuticulares, o que, favoreceu a infecção por *Cylindrosporium concentricum* (RAWLINSON *et al.*, 1978).

O efeito herbicida é mais complexo e depende do mecanismo de ação do herbicida utilizado. O glyphosate é um herbicida não seletivo e seu mecanismo de ação afeta a rota do ácido chiquímico, precursor envolvido na defesa de plantas a patógenos, destacando-se: taninos, antocianinas, ácido salicílico, lignina, flavonas, isoflavonas e cumarinas (BUCHANAN *et al.*, 2000; SRIVASTAVA, 2001). Dessa forma, plantas sensíveis previamente expostas ao glyphosate podem tornar-se mais vulneráveis ao ataque de patógenos.

Por outro lado, o glyphosate pode apresentar efeitos prejudiciais diretos sobre a germinação de esporos fúngicos (FIGURA 1f) ou no crescimento de hifas fúngicas (FIGURA 1g). A rota do chiquimato é afetada pelo herbicida glyphosate e também está presente em fungos e bactérias (RICHARDS *et al.*, 2006), por isso a importância desse herbicida no manejo de agentes fitopatogênicos. O glyphosate inibiu o crescimento de *Rhizoctonia solani*, *Ceratocystis fimbriata*, *Cryphonectria cubensis*, *Phytophthora capsici*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* e *Mirothecium roridum*, que são fungos causadores de doenças importantes em feijoeiro, mangueira, eucalipto, pimentão e tomateiro (ROSA *et al.*, 2010). Efeito inibitório desse herbicida também foi relatado por Tuffi Santos *et al.* (2011) sobre a germinação e crescimento *in vitro* de *Puccinia psidii* causador da ferrugem do eucalipto.

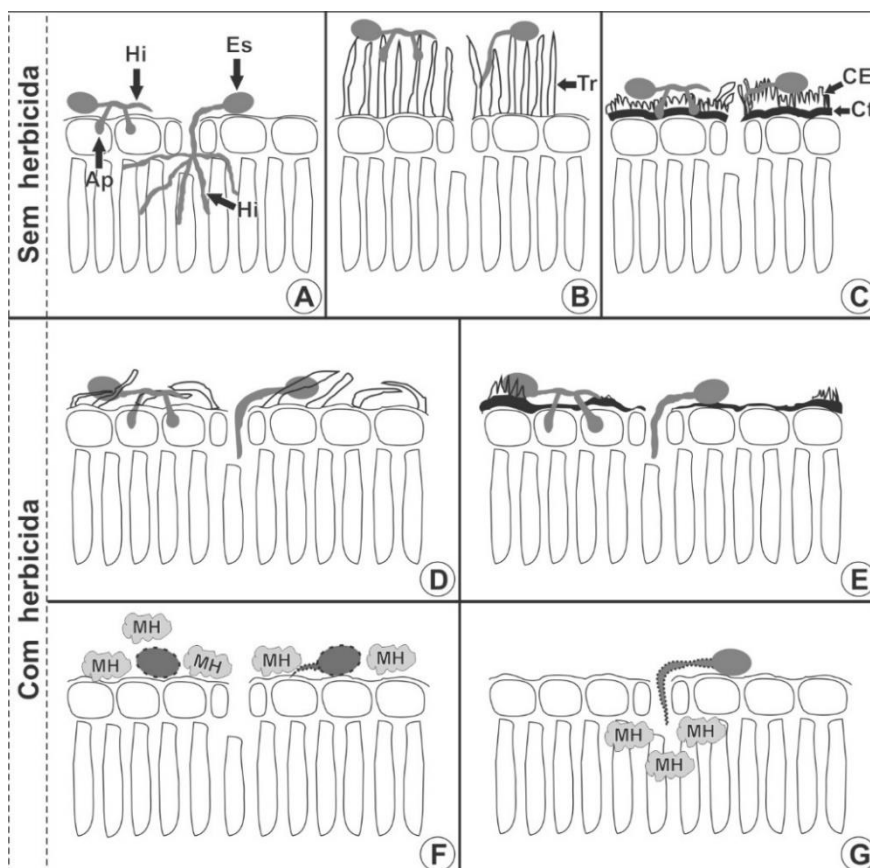
Outro grupo importante é constituído pelos herbicidas inibidores da PROTOX, como o herbicida carfentrazone-ethyl. Ao inibir a síntese dessa enzima, ocorre acúmulo de protoporfirinogênio IX, que, na presença de luz e de oxigênio, resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (SILVA; SILVA, 2012), que são compostos importantes na defesa de plantas aos patógenos, uma vez que fazem parte dos mecanismos bioquímicos pós-

formados (STANGARLIN *et al.*, 2011). Por outro lado, plantas sensíveis tratadas com esses herbicidas apresentam pontos necróticos nas folhas, já que, na presença de luz, essas espécies reativas de oxigênio acionam a peroxidação de lipídeos, resultando na morte celular por degeneração das membranas plasmáticas. Tal fato reduz a infecção por patógenos biotróficos, que obrigatoriamente necessitam de tecido hospedeiro vivo para se instalar e reproduzir (BEDENDO, 2011).

Além do efeito direto sobre o patógeno ou indireto sobre os mecanismos de defesa das plantas aos patógenos, as plantas daninhas podem ser hospedeiras em potencial para uma gama variada de agentes fitopatogênicos (NTIDI *et al.*, 2012; ALTINOK, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2015). Nesse sentido, o uso de herbicidas para manejo de plantas daninhas representa grande importância no surgimento e severidade de algumas doenças. O uso de herbicidas é a principal estratégia utilizada para o manejo da podridão radicular causada por *Rhizoctonia solani* e *Rhizoctonia oryzae* em cultivos de cevada (BABIKER *et al.*, 2011). Em três anos de experimentos em campo, os autores supracitados observaram que, quando o manejo químico de plantas daninhas com glyphosate era empregado, houve redução significativa da gravidade da doença na safra seguinte (BABIKER *et al.*, 2011). Entretanto, a ação herbicida leva à redução da biodiversidade vegetal nas áreas cultivadas decorrente do controle de plantas daninhas. E a presença de uma espécie cultivada isoladamente pode favorecer certas doenças (ALTIERE, 1999).

Outro ponto importante é a influência do uso de herbicidas sobre insetos, que muitas vezes podem atuar como vetores, sobretudo em doenças causadas por vírus (GUTIÉRREZ *et al.*, 2013; MAUCK *et al.*, 2015). Egan *et al.* (2014) observaram redução de três espécies de herbívoros e o aumento de uma espécie praga quando expostos ao herbicida dicamba.

Figura 1 - Ação herbicida indireta sobre os mecanismos de defesa estruturais de plantas aos patógenos (B-E) e direta sobre a germinação de esporos ou crescimento de hifas (F-G). **A.** Hospedeiro sem mecanismos de defesa; Esporos (Es) germinam e hifas (Hi) penetram de forma direta através de apressórios (Ap) ou por aberturas naturais. **B.** Na presença de tricomas (Tr) os esporos germinam, mas não atingem a epiderme. **C.** Cutícula espessa (Ct) e ceras epicuticulares (CE) formam barreiras à penetração. **D.** Efeito dos herbicidas sobre os tricomas favorece a penetração. **E.** Degerneração das ceras epicuticulares e cutícula, facilitando a penetração. **F e G.** Moléculas herbicidas (MH) inibem a germinação de esporos.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2016, a partir de informações extraídas dos trabalhos WYSS; MÜLLER-SCHÄRER, 2001; LARSON *et al.*, 2006; TUFFI-SANTOS *et al.*, 2009; ROSA *et al.*, 2010; AMORIM; PASCHOLATI, 2011; STANGARLIN *et al.*, 2011; TUFFI-SANTOS *et al.*, 2011; e SANTOS *et al.*, 2015.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção das mudas

Para condução dos experimentos foram utilizadas mudas de dois clones de *Eucalyptus grandis*, G-21 e G-33, previamente classificados como resistente (JUNGHANS *et al.*, 2003a) e suscetível, respectivamente. As mudas foram cultivadas e cedidas pela Clonar Resistência a Doenças Florestais LTDA. Aos 60 dias de idade, estas foram transplantadas para vasos de 2l, contendo substrato MecPlant® enriquecido com 1,3kg de fosfato super simples e 600g de Osmocote® (NPK, 19-6-10) para cada 100kg de substrato. Durante o transplântio cada muda recebeu 100ml de solução de MAP®. Em seguida, foram mantidas em casa de vegetação até o momento da inoculação. Vinte dias após transplântio (DAT) as mudas se encontravam com altura entre 30-40cm e bem galhadas (aproximadamente 10 galhos).

3.2. Instalação dos experimentos

O trabalho foi realizado em dois ensaios consecutivos, sendo o primeiro em fevereiro de 2015 e o segundo em abril do mesmo ano, mantendo-se as mudas e o método, à exceção da concentração de inóculo. Após o término do primeiro, ensaio, as plantas foram podadas, para retirada dos galhos que receberam aplicação herbicida e de folhas que estavam infectadas. Posteriormente, as plantas foram adubadas com 100 ml/planta de solução do adubo Biofert Universal® (NPK: 6-4-4), diluído em água (1:100). As plantas permaneceram em repouso por 20 dias. Em seguida, quando não apresentavam mais sintomas de intoxicação causada pelo herbicida, foi realizado o segundo ensaio.

Em ambos os ensaios, utilizou-se delineamento experimental em blocos casualizados com 10 repetições, em esquema fatorial 2 x 4 (dois clones e quatro subdoses de herbicidas). Para cada parcela experimental, foi considerado um vaso contendo uma planta de eucalipto. Os herbicidas testados foram o carfentrazone-ethyl, em sua formulação comercial

SPOTLIGHT® e o glyphosate na formulação ROUNDUP ORIGINAL®. As subdoses testadas foram 0 (controle); 6% da dose máxima recomendada pelo fabricante (50g e.a. ha⁻¹) de carfentrazone-ethyl; 6% da dose recomendada (1440g e.a. ha⁻¹) de glyphosate; e a dose em mistura (6% carfentrazone-ethyl + 6% de glyphosate).

3.3. Aplicação dos herbicidas

No primeiro ensaio, a aplicação foi realizada aos 20 DAT das mudas, enquanto no segundo ensaio, ela foi realizada em abril (20 dias após o término do primeiro ensaio). Ambas as aplicações foram realizadas simulando deriva no terço inferior da copa das plantas de eucalipto. Utilizou-se pulverizador costal pressurizado por CO₂, equipado com barra contendo dois bicos modelo TT 110.02, calibrado para aplicar 150 L ha⁻¹ de calda. Para evitar contato do produto com outras partes da planta, a parte superior da copa foi protegida por saco plástico no momento da aplicação, de modo a deixar apenas a porção inferior da copa (aproximadamente 3 galhos) exposta ao produto.

3.4. Inoculação do patógeno

A inoculação foi realizada dois dias após a aplicação dos herbicidas. Utilizou-se o isolado UFV-2 de *Puccinia psidii* (raça 1), obtidos de plantas de *Eucalyptus grandis* em Itapetininga, São Paulo, Brasil (XAVIER *et al.*, 2001), cuja coleção encontra-se depositada na micoteca da UFV. O isolado foi previamente multiplicado em mudas de Jambo (*Syzygium jambos*) (RUIZ *et al.*, 1989). Os urediniósporos produzidos foram coletados aos 12 dias após inoculação em Jambo, e, para inoculação nas plantas de eucalipto, preparou-se suspensão com concentração de 2x10⁴ mL⁻¹ para o primeiro ensaio, e de 2x10⁵ mL⁻¹ para o ensaio realizado em abril.

A suspensão de urediniósporos foi atomizada homogeneamente em ambas as faces do limbo foliar, por toda planta, com o auxílio de atomizador De Vilbiss® n.º 15, acoplado a um compressor elétrico (0,6-0,8 kgf cm⁻²). Para

aférir a eficiência da inoculação, foram distribuídas aleatoriamente, em meio às plantas de eucalipto, três plantas de Jambo (espécie suscetível a ferrugem). As mudas inoculadas foram mantidas em câmara de nevoeiro, no escuro, por 24 horas e posteriormente levadas para câmara de crescimento com temperatura ajustada para 22°C, com fotoperíodo de 12 horas (RUIZ *et al.*, 1989) e intensidade luminosa de 130 $\mu\text{moles de f\u00f3tons m}^2 \text{ s}^{-1}$.

3.5. Avaliação da tolerância dos clones aos herbicidas

A tolerância dos clones aos herbicidas foi avaliada através do percentual de fitointoxicação, do crescimento das plantas em altura e da produção de massa seca da parte aérea (MSPA). As avaliações de fitointoxicação foram realizadas aos 23 dias após a aplicação (DAA), através de observações visuais, em que se adota escala de 0 a 100%, na qual zero é a ausência de intoxicação e 100% a morte da planta. Observações diárias durante todo o período de condução dos ensaios foram realizadas para avaliação de possíveis sintomas de intoxicação causados pelos herbicidas.

Ao final do ensaio 2, para avaliar o crescimento, foi mensurada a altura total entre a base do substrato até o ápice de todas as plantas. Em seguida, as plantas foram coletadas rente ao substrato e armazenadas em sacos de papel. Após secagem em estufa de ventilação forçada ajustada para 65°C, as plantas foram pesadas diariamente durante cinco dias até atingirem peso constante.

3.6. Avaliação da severidade da ferrugem

A avaliação da severidade foi realizada aos 21 DAI, através do índice de McKinney (I_{Mc}), índice médio de área foliar infectada e do número médio de urediniosporos produzidos. Para isso, em cada planta, foram marcados três galhos representativos do estágio de infecção da planta e em cada galho foram escolhidas duas folhas.

Para gerar o índice de incidência da doença, foi realizada avaliação visual, atribuindo notas por meio de escala diagramática com quatro classes

de severidade (S0, S1, S2 e S3) (JUNGHANS *et al.*, 2003b), sendo S0=0, S1=1, S2=2 e S3=3. O índice de McKinney (MCKINNEY, 1923; modificado por COOKE, 2006) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$(I_{mc})\% = \frac{\sum (f \times v)}{N \times X} \times 100$$

na qual: f = classe de infecção; v = número de folha que apresentou cada classe; N = total de folhas avaliadas; X = maior valor entre as classes (nota 3).

As duas folhas escolhidas de cada ramo para avaliar o I_{Mc} foram coletadas e fotografadas. As imagens foram submetidas ao *software* de análise de imagem, *Image Pro-Plus Versão 4.5*, para determinação do índice de área foliar infectada (Iafi), obtido através da divisão da área infectada pela área sadia. Após obtenção das imagens, foram retirados de cada folha, com auxílio de furador de 6mm de diâmetro, dois discos, que foram colocados em tubo do tipo Eppendorfs de 2 mL, no qual foi adicionado 10 μ L de Tween 20[®], sendo o volume completado com água destilada. Após homogeneização em agitador magnético por um minuto, 170 μ L da suspensão foi transferida para câmara de Neubauer, e a contagem do número médio de uredinióporos produzidos (NMUP) foi realizada em duplicata, em microscópio de luz.

3.7. Análises fisiológicas

A fisiologia dos clones de eucalipto foi avaliada aos quatro e aos 23 DAA, em folhas expandidas da parte apical da copa (protegida da aplicação). Os parâmetros avaliados foram a condutância estomática, a taxa fotossintética líquida e o rendimento efetivo do fotossistema II, sendo esse último, obtido através da fluorescência da clorofila a. Para determinar a troca de gases da folha foi utilizado analisador portátil de fotossíntese LI-6400 XT. Durante a avaliação, utilizou-se luz interna controlada, na intensidade de 1000 μ moles de fótons $m^2 s^{-1}$ e CO₂ ajustado para 400 μ moles mol^{-1} . As

leituras foram feitas em triplicatas e registradas quando o coeficiente de variação (CV) do aparelho se encontrava abaixo de 5%.

3.8. Anatomia e ultraestrutura foliar

Para avaliar os efeitos dos herbicidas na anatomia e ultraestrutura foliar nas plantas de eucalipto e a histopatologia da interação *Puccinia psidii* X *Eucalyptus grandis*, amostras foliares foram coletadas para análise em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.

As coletas foram realizadas aos 0, 2, 6 e 12 dias após inoculação (DAI). A coleta no tempo zero, exclusivamente com intuito de avaliar os efeitos provocados pelo herbicida foi realizada imediatamente antes da inoculação e em folhas de galhos do terço inferior da copa sujeitas à aplicação do herbicida. As demais coletas foram realizadas em folhas da parte apical da copa. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) e, para melhor penetração da solução fixadora, estas foram colocadas em dessecador, sendo o ar retirado com bomba de vácuo (0,1mmHg) por 20 minutos.

Para análise em microscopia de luz, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%, sendo esta última lavagem repetida 3 vezes) e polimerizadas em resina acrílica tipo metacrilato. Cortes transversais com 7 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo manual Reichert, corados em azul de toluidina pH=4,0 (O'BRIEN; McCULLY, 1981) e montados em lâmina e lamínula, utilizando como meio de montagem o Entellan®. Após observação, foi realizada documentação fotográfica, utilizando microscópio de luz (modelo Zeiss Axioskop 2) com câmera digital acoplada (modelo MRC3).

Para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratadas em série de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%, repetindo-se a última lavagem 3 vezes) e secas ao ponto crítico (modelo Balzers CPD 030). Após montagem em "stubs" utilizando fita de carbono dupla face, as amostras receberam cobertura com ouro em metalizador (modelo Balzers SCD 050). Em seguida,

o material foi analisado em microscópio eletrônico de varredura (modelo Zeiss LEO 435-VP), sendo as imagens registradas em arquivos digitais.

Para análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET), as amostras foram retiradas do Karnovsky lavadas por três sessões (10 minutos cada) em tampão cacodilato a 0,05M e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por uma hora. Em seguida, contrastadas em acetato de uranila a 0,5% (pernoite), desidratadas em acetona (30, 50, 70, 90 e 100%, sendo esta última lavagem repetida 3 vezes) e polimerizadas em resina (SPURR), permanecendo em estufa a 70°C por período de três dias. Após obtenção dos bloquinhos (material polimerizado), foram realizados cortes ultrafinos (70nm de espessura), que foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963), sendo observados ao microscópio eletrônico de transmissão.

3.9. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando pertinente, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Dados avaliados nos dois ensaios como a fitointoxicação e os dados de severidade da ferrugem tiveram os resultados processados e analisados através da análise conjunta de dados (OLIVEIRA, 1993). As variáveis quantitativas estudadas foram submetidas ao teste de correlação de Pearson.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Tolerância dos clones aos herbicidas

4.1.1. Efeitos dos herbicidas na morfologia, anatomia e ultraestrutura foliar e na fisiologia das plantas

Folhas da parte basal da copa das plantas de eucalipto expostas à aplicação de 3g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl, apresentaram pontos cloróticos e necróticos 24h após aplicação (FIGURA 2). Na parte apical da copa, protegida da aplicação, os sintomas começaram a aparecer aos 10 dias após aplicação (DAA) (FIGURA 3).

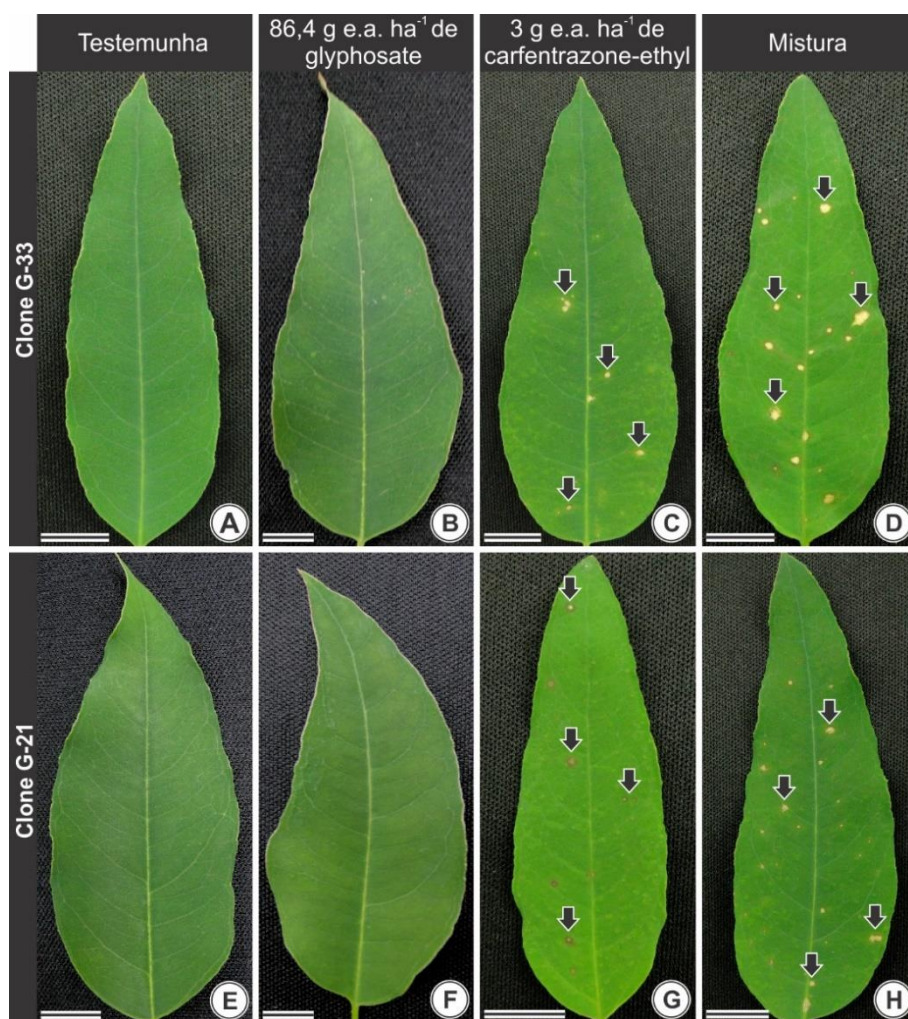
Plantas dos clones G-33 e G-21 submetidas à aplicação dos herbicidas apresentaram clorose no ápice e bordas foliares (FIGURAS 3b-d, f, h). Porém, nas plantas do G-21 expostas a 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl, nenhum sintoma visual de intoxicação foi observado (FIGURA 3g).

Os sintomas evoluíram e, aos 23 DAA, as plantas dos dois clones que receberam as aplicações dos herbicidas apresentaram clorose distribuída por todo o limbo foliar (FIGURA 4), à exceção das plantas do clone G-21 submetidas à subdose isolada de carfentrazone-ethyl. Estas não apresentaram sintomas de intoxicação na parte apical da copa (FIGURA 4g).

O carfentrazone-ethyl é um herbicida de efeito rápido. Plantas sensíveis tratadas com esse herbicida acumulam protoporfirinogênio IX, que na presença da luz, catalisa a formação do oxigênio singlete, responsável pela peroxidação de lipídeos e degeneração das membranas plasmáticas (SILVA; SILVA, 2012). Assim, pontos necróticos de coloração marrom ou palha (FIGURA 2) são os sintomas mais característicos da intoxicação por carfentrazone-ethyl, os quais podem aparecer no mesmo dia da aplicação do produto. Tais sintomas também foram observados por Tuffi-Santos *et al.* (2006), em plantas de eucalipto aos dois dias após aplicação (DAA). Entretanto, o herbicida glyphosate possui efeito mais lento. Embora existam relatos do surgimento de clorose em eucalipto aos 4 e aos 6 dias após aplicação (TUFFI-SANTOS *et al.*, 2007; TUFFI-SANTOS *et al.*, 2006), no

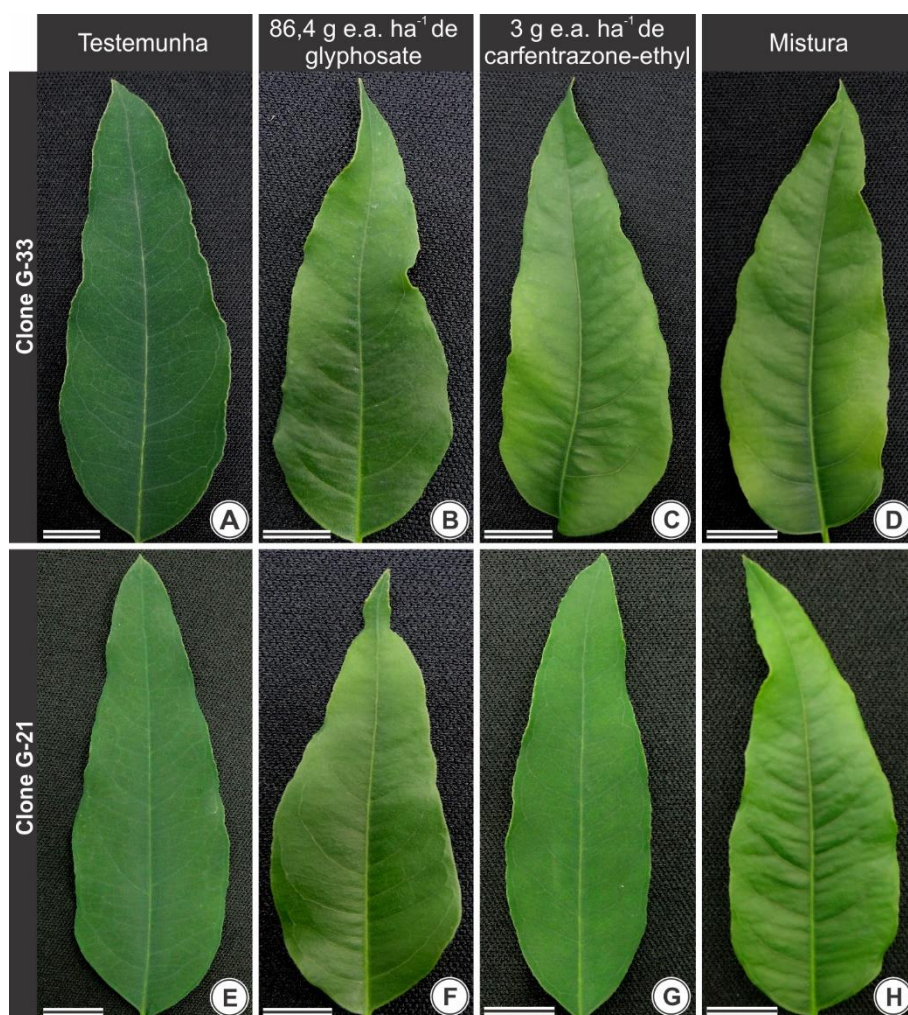
presente trabalho, os primeiros sintomas foram observados aos 10 DAA. Essa diferença na velocidade de aparecimento dos sintomas de intoxicação pode estar ligada à dose do glyphosate utilizada e ao genótipo envolvido.

Figura 2 - Efeito da deriva dos herbicidas em folhas da parte basal da copa, exposta à aplicação, de clones de *Eucalyptus grandis* 24 horas após aplicação. **A, B, E e F.** Folhas sem presença de sintomas de intoxicação. **C, D, G e H.** Folhas com sintomas de intoxicação. Setas indicam pontos necróticos causados pelo carfentrazone-ethyl. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl. Barras = 1cm.



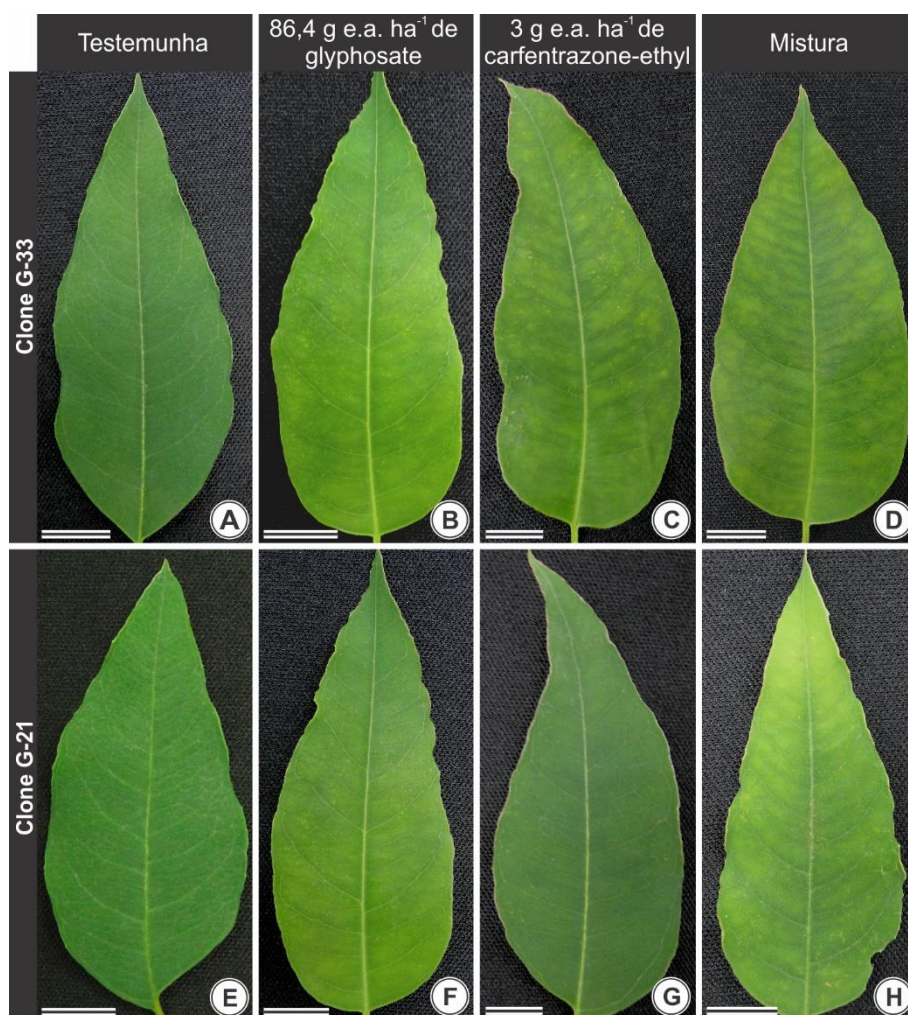
Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

Figura 3 - Efeito da deriva dos herbicidas em folhas da parte apical da copa, protegida da aplicação, de clones de *Eucalyptus grandis* 10 dias após aplicação. **A, E e G.** Folhas sem presença de sintomas de intoxicação. **B, C, D, F, G e H.** Folhas com sintomas de intoxicação com clorose na borda e ápice foliar. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl. Barras = 1cm.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

Figura 4 - Efeito da deriva dos herbicidas em folhas da parte apical da copa, protegida da aplicação, de clones de *Eucalyptus grandis* 23 dias após aplicação. **A, E e G.** Folhas sem presença de sintomas de intoxicação. **B, C, D, G e H.** Folhas com sintomas de intoxicação com clorose distribuída por todo limbo foliar. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl. Barras = 1cm.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

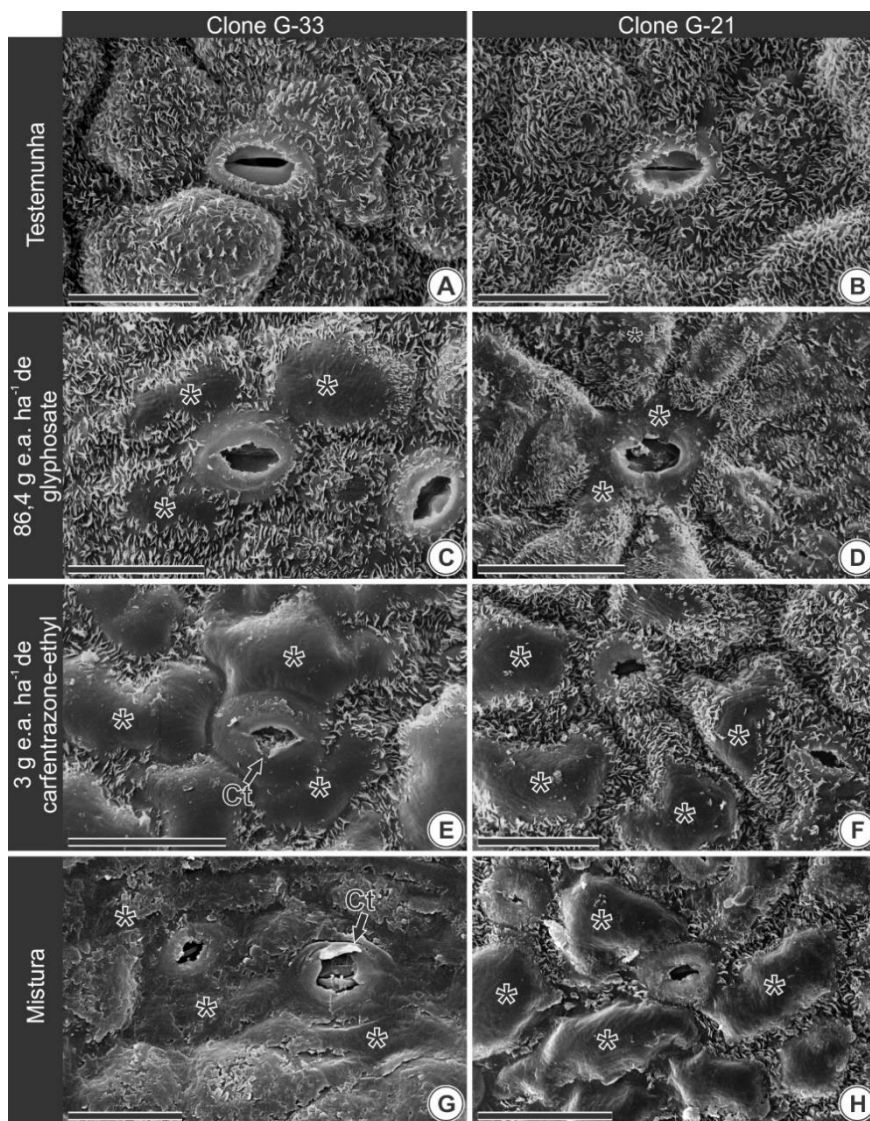
Em relação aos efeitos na anatomia e ultraestrutura foliar, plantas tratadas com subdoses de glyphosate e carfentrazone-ethyl, aplicados isoladamente, apresentaram células com ceras epicuticulares erodidas nas faces abaxial (FIGURA 5) e adaxial (FIGURA 6) da epiderme. Além da erosão das ceras epicuticulares, plantas do clone G-33 expostas à deriva de carfentrazone-ethyl e da subdose em mistura (glyphosate + carfentrazone-ethyl) apresentam perda de turgor e ruptura da cutícula das células-guardas do estômato (FIGURAS 5e, g).

Em corte transversal, nota-se que o efeito mais prejudicial avaliado aos dois dias após aplicação dos herbicidas foi provocado pela aplicação de carfentrazone-ethyl (FIGURA 7). Folhas dos dois clones diretamente expostas à aplicação do referido herbicida apresentaram células da epiderme adaxial e dos parênquimas paliçádico e lacunoso degradadas (FIGURAS 7e-h).

A erosão de ceras epicuticulares e degeneração da cutícula, decorrentes do efeito de adjuvantes presentes na formulação comercial dos herbicidas, também já foram relatados anteriormente para o eucalipto (TUFFI-SANTOS *et al.*, 2009) e para outras plantas (RAWLINSON *et al.*, 1978; SANTOS *et al.*, 2015; TUFFI-SANTOS *et al.*, 2015).

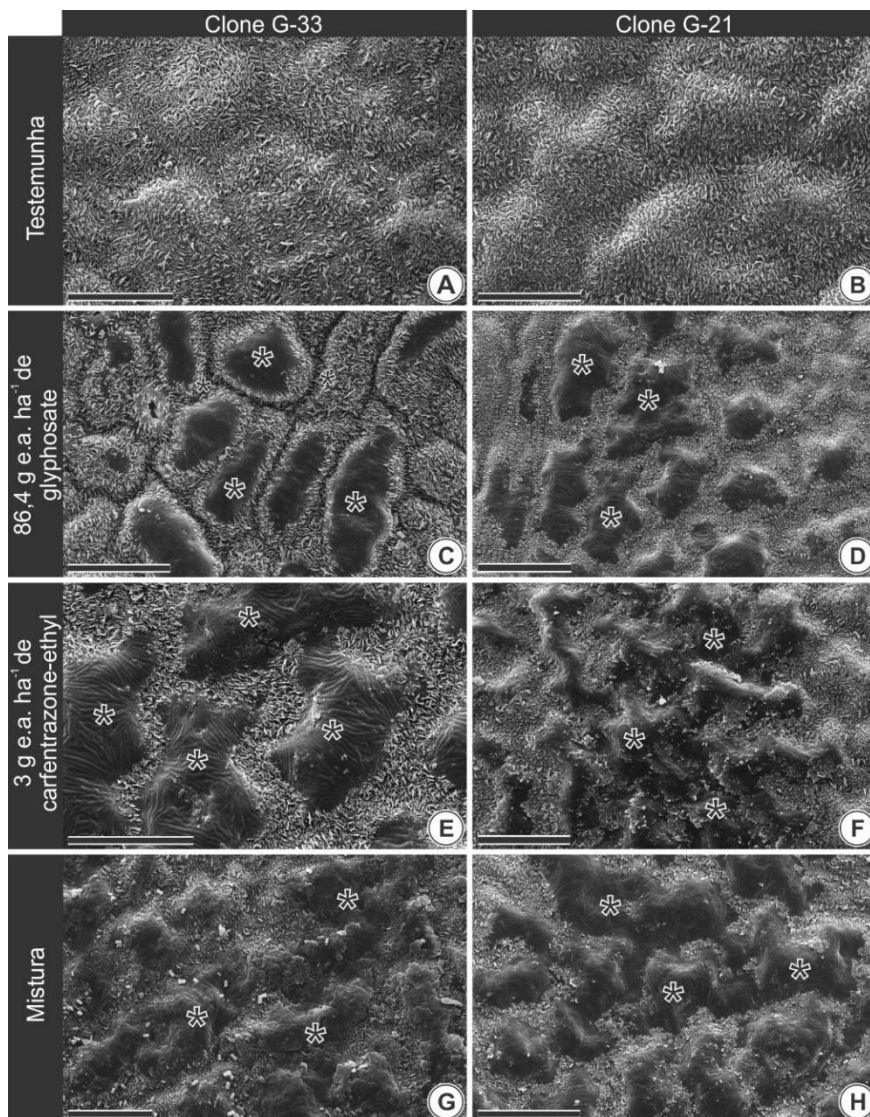
O herbicida carfentrazone-ethyl inibe a síntese da enzima protoporfirinogênio oxidase, que nas plantas, encontra-se nos cloroplastos (SILVA; SILVA, 2012). Isso pode explicar a degeneração de células de parênquima paliçádico, que é o tecido mais fotossinteticamente ativo, bem como a desorganização dos tilacoides dos cloroplastos, observadas em folhas expostas deriva desse herbicida.

Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura. Efeito da deriva dos herbicidas na face abaxial de folhas da parte basal da copa, exposta à aplicação, em clones de *Eucalyptus grandis* 2 dias após aplicação. **A-B**. Células do complexo estomático com turgor e ceras epicuticulares com conformação característica a espécie. **C-H**. Ceras epicuticulares erodidas (asteriscos). **E e G**. Degeneração de parede, seta indica ruptura da cutícula (Ct) nas células guardas do complexo estomático. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl. Barras = 25 µm.



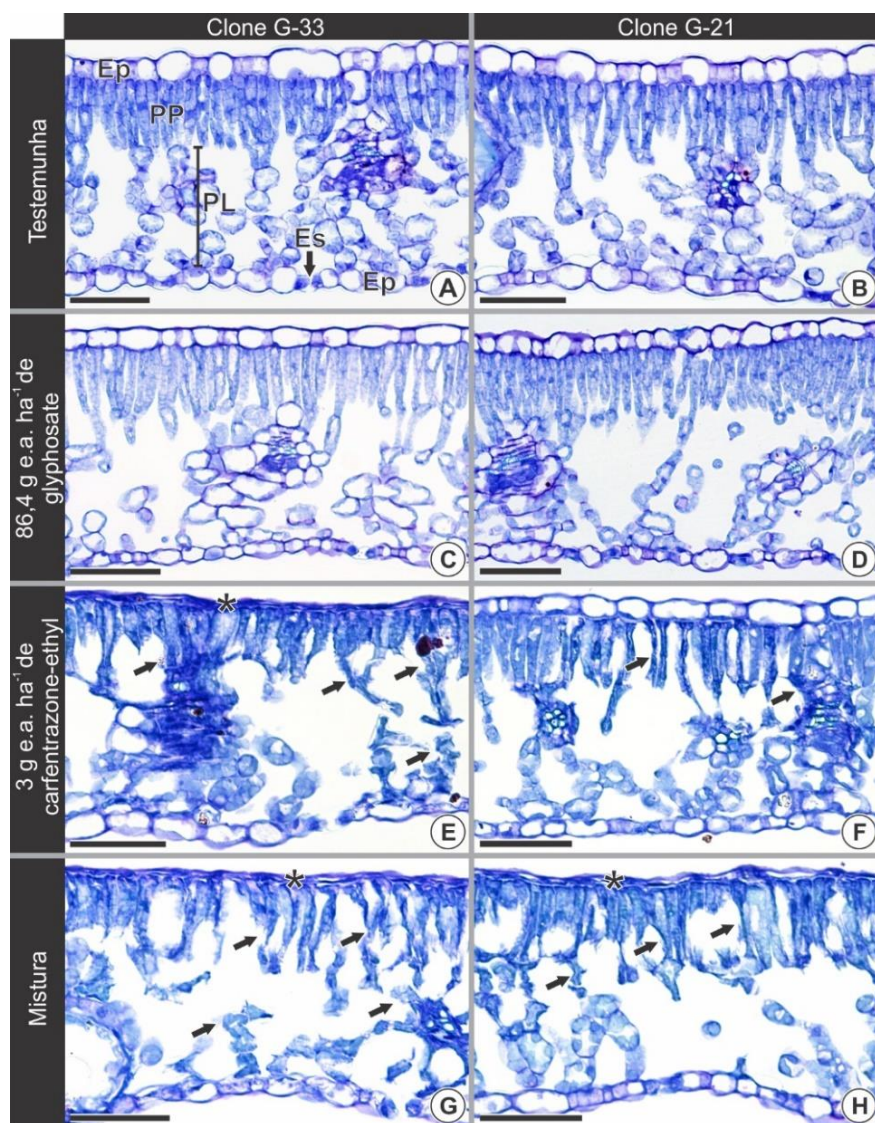
Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura. Efeito da deriva dos herbicidas na face adaxial de folhas da parte basal da copa, exposta à aplicação, em clones de *Eucalyptus grandis* 2 dias após aplicação. **A-B.** Células epidérmicas com turgor e ceras epicuticulares com conformação característica à espécie. **C-H.** Ceras epicuticulares erodidas (asteriscos). Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl. Barras = 25 µm.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

Figura 7 - Microscopia de luz. Efeito da deriva dos herbicidas em folhas da parte basal da copa, exposta à aplicação, de clones de *Eucalyptus grandis* 2 dias após aplicação. **A-D**. Células com conformação e turgor característico à espécie. **E-H**. Células epidérmicas degradadas (asteriscos); células parenquimáticas com perda de turgor (setas). Abreviações: Ep – epiderme; PP – parênquima paliçádico; PL – parênquima lacunoso; Es – estômato. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl. Barras = 25 µm.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

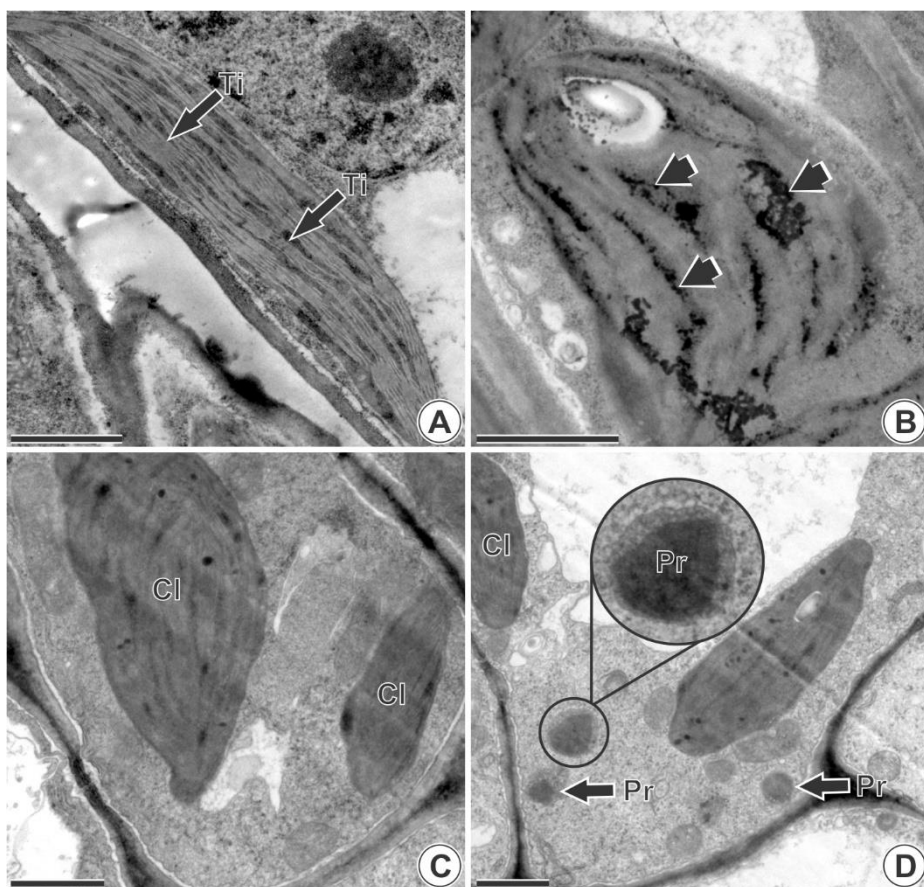
Em microscopia eletrônica de transmissão, nota-se que folhas sadias oriundas de plantas testemunha apresentam cloroplastos com tilacoides bem organizados em grana (FIGURA 8a). Entretanto, folhas cloróticas decorrentes do efeito herbicida apresentam cloroplastos com tilacoides totalmente desorganizados (FIGURA 8b). Outro efeito importante foi a presença de peroxissomos em células de plantas do clone G-33 expostas à deriva de carfentrazone-ethyl (FIGURA 8d). Tais organelas não foram observadas em plantas testemunha (FIGURA 8c).

Plantas dos dois clones submetidas à deriva dos herbicidas apresentaram acúmulo de grãos de amido nos cloroplastos (FIGURA 9), sobretudo quando tratadas com glyphosate (FIGURAS 9c-d) e com a mistura dos herbicidas (FIGURAS 9g-h). Os grãos de amido observados em plantas do clone G-33, que sofreram deriva da subdose isolada de carfentrazone-ethyl, são bem maiores em relação aos observados em plantas do clone G-21 (FIGURAS 9e, f, respectivamente).

Com relação aos parâmetros fisiológicos avaliados, plantas do clone G-33 previamente tratadas com os herbicidas apresentaram menor rendimento efetivo do FSII aos 4 DAA (FIGURA 10a). Entretanto, a aplicação herbicida não alterou o rendimento do FSII nas plantas do clone G-21 (FIGURA 10a). Nessa mesma época, a taxa fotossintética líquida também foi menor apenas nas plantas do clone G-33 expostas à aplicação das subdoses de carfentrazone e da mistura dos herbicidas, respectivamente (FIGURA 10b). Ainda aos 4 DAA, a condutância estomática só foi menor nas plantas do clone G-33 que receberam a mistura de carfentrazone-ethyl e glyphosate.

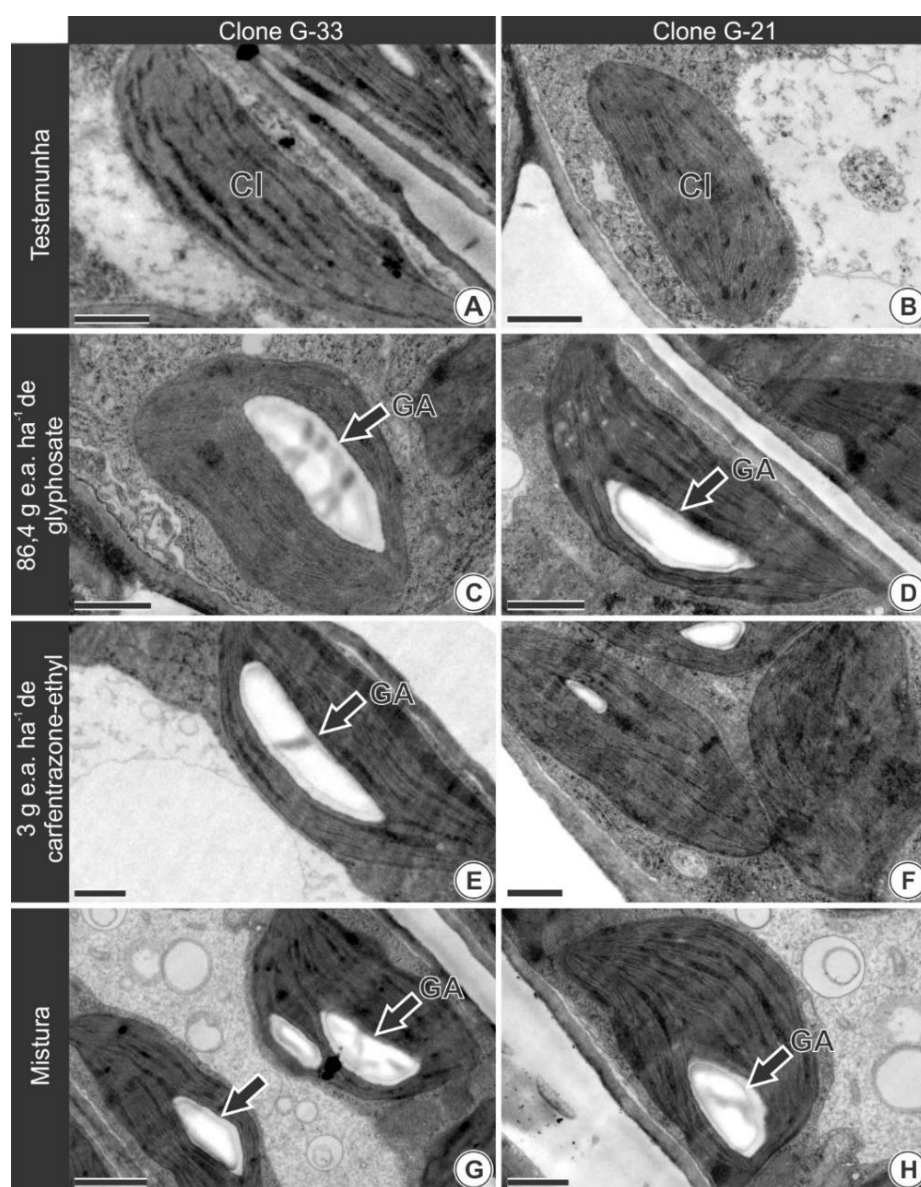
Aos 23 DAA, plantas do clone G-33, expostas às aplicações das subdoses de glyphosate, carfentrazone e da mistura desses herbicidas, apresentaram redução no rendimento efetivo FSII, na taxa fotossintética e na condutância estomática (FIGURA 11). Resultado semelhante foi observado nas plantas do clone G-21, com exceção das que receberam aplicação da subdose isolada de carfentrazone (FIGURAS 11a, b, c).

Figura 8 - Microscopia eletrônica de transmissão. Efeito da deriva dos herbicidas em folhas da parte apical da copa, protegida da aplicação, de clones de *Eucalyptus grandis* 14 dias após aplicação. **A.** Cloroplasto de uma folha sadia (planta testemunha) com os tilacóides (Ti) perfeitamente organizados em granum. **B.** Cloroplasto (Cl) de uma folha clorótica (planta exposta à deriva dos herbicidas) com tilacóides totalmente desorganizados. **C.** Célula de folha oriunda de uma planta testemunha. Nas amostras analisadas não foram observadas presença de peroxissomos. **D.** Célula de planta exposta à deriva de carfentrazone-ethyl com presença de peroxissomos (Pr); detalhe evidenciando tal organela. Barras = 1 µm.



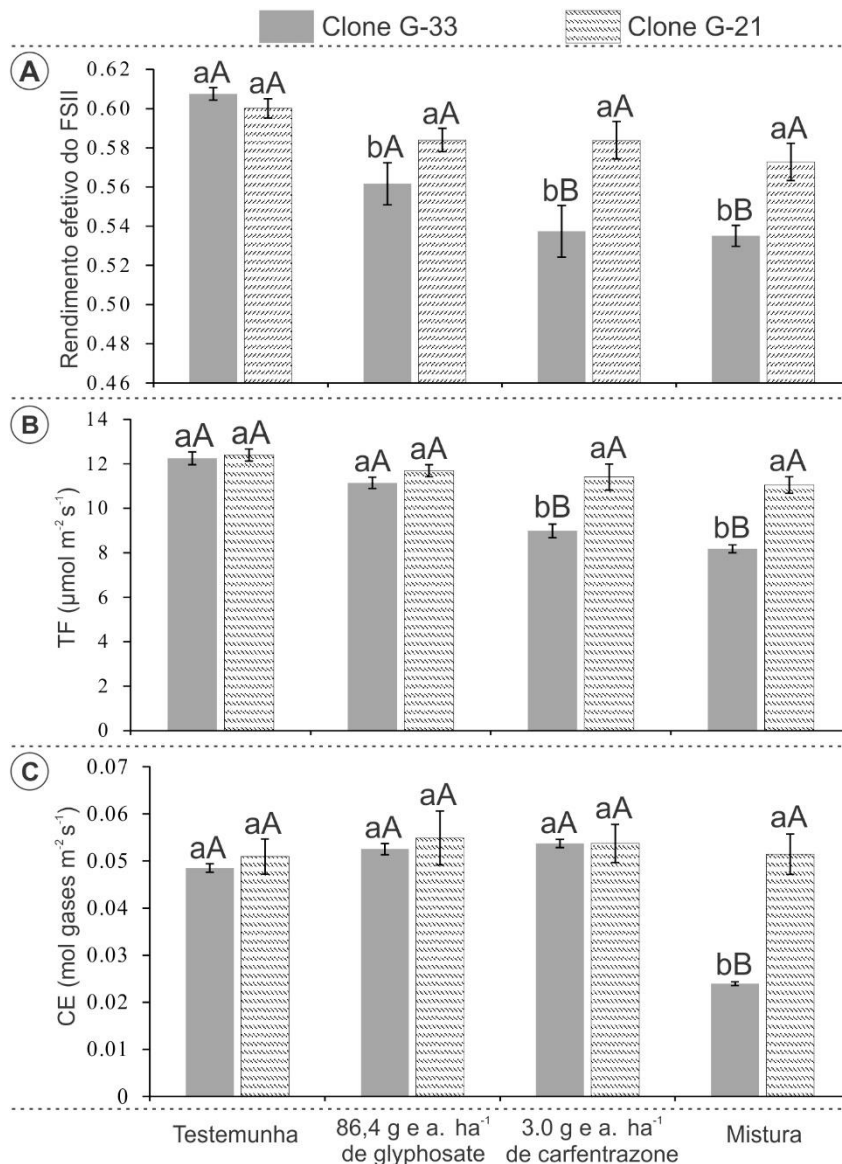
Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

Figura 9 - Microscopia eletrônica de transmissão. Acúmulo de grãos de amido nos cloroplastos de folhas da parte apical da copa, protegida da aplicação, de *Eucalyptus grandis* 14 dias após aplicação. **A-B**. Cloroplastos sem grão de amido. **C-H**. Cloroplastos com presença de grãos de amido (setas). Abreviações: CI – cloroplasto; GA – grão de amido. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl. Barras = 1 µm.



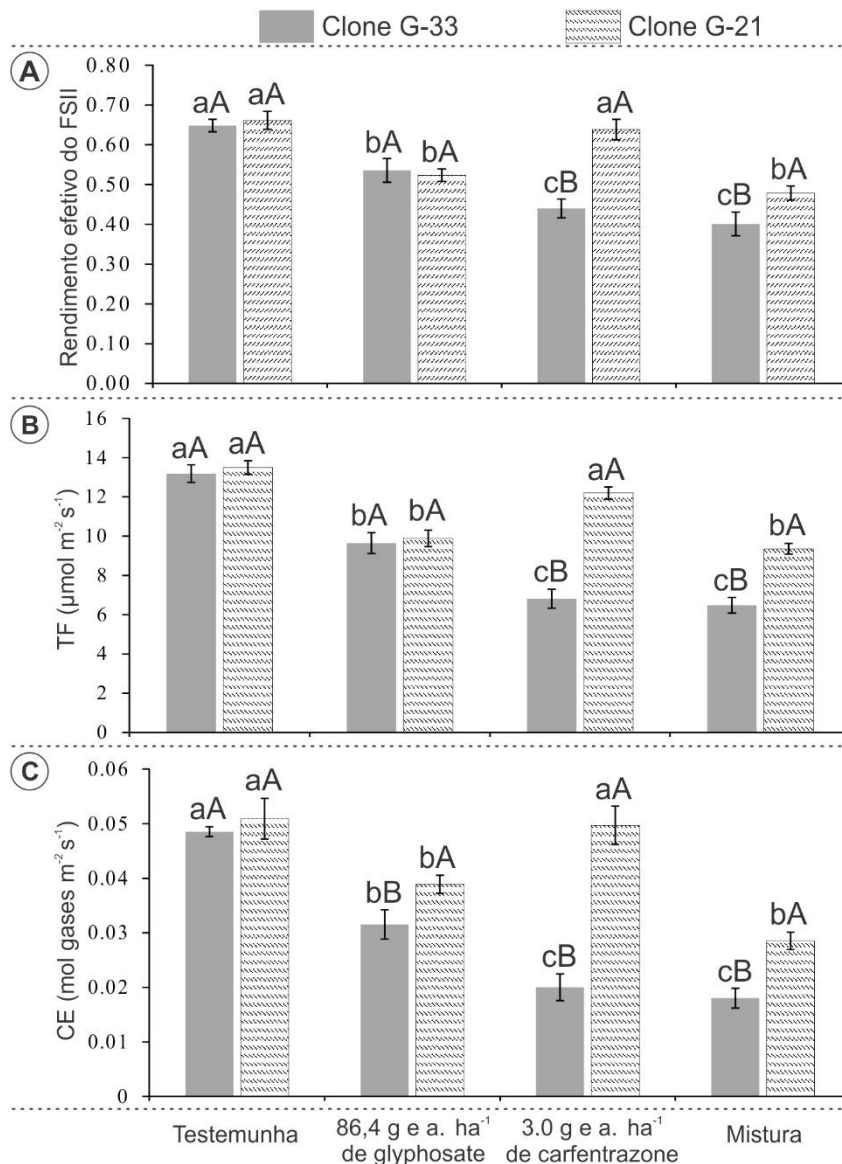
Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

Figura 10 - Rendimento efetivo do FS II (A), Taxa fotossintética líquida (B) e Condutância estomática (C) 4 dias após aplicação dos herbicidas. Letras minúsculas comparam as médias dentro de um mesmo clone, enquanto que as maiúsculas dentro do mesmo tratamento herbicida. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Barras = erro padrão da média. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

Figura 11 - Rendimento efetivo do FS II (A), taxa fotossintética líquida (B) e condutância estomática (C) 23 dias após aplicação dos herbicidas. Letras minúsculas comparam as médias dentro de um mesmo clone, enquanto que as maiúsculas dentro do mesmo tratamento herbicida. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Barras = erro padrão da média. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

A ação mais rápida do herbicida carfentrazone-ethyl pode explicar as alterações nos parâmetros fisiológicos das plantas do clone G-33, já na primeira avaliação realizada aos 4 DAA. No clone G-21 a fisiologia só foi afetada aos 23 DAA e apenas nas plantas expostas à deriva de glyphosate. Isso também reforça a maior tolerância do clone G-21 ao carfentrazone-ethyl. A redução na taxa fotossintética em plantas expostas à aplicação de herbicidas, conforme demonstram os resultados do presente trabalho, é comum e tem sido relatada na literatura (MACHADO *et al.*, 2010; LANGARO *et al.*, 2014). A forte correlação entre as variáveis estudadas (TABELA 1) reforça o efeito prejudicial dos herbicidas sobre a fisiologia, o crescimento e desenvolvimento dos clones.

O acúmulo de grãos de amido nos cloroplastos de plantas expostas à deriva dos herbicidas está relacionado, possivelmente, à queda da taxa respiratória. A respiração vegetal consiste na oxidação da glicose para obtenção de energia, que é usada pelas plantas em seus processos vitais que se resumem a crescer, desenvolver, e em alguns casos, reproduzir (TAIZ; ZEIGER, 2013). As plantas respiram dia e noite. Durante o dia, a glicose usada na respiração é oriunda diretamente da fotossíntese, já à noite ela é proveniente das reservas acumuladas durante o dia, geralmente na forma de grãos de amido (TAIZ; ZEIGER, 2013). A Figura 9 representa cloroplastos de folhas coletadas às 8 horas da manhã, portanto os grãos de amido acumulados não foram consumidos na respiração da noite anterior. Embora não tenha sido avaliada a taxa respiratória no presente trabalho, o acúmulo de amido aliado à redução do crescimento e desenvolvimento dos clones expostos à deriva herbicida são fortes evidências da queda na taxa respiratória. Queda na taxa respiratória em plantas expostas à aplicação de herbicidas já tem sido reportada na literatura (HECKMAN *et al.*, 2002; DING *et al.*, 2011).

Esse acúmulo de amido também pode ter afetado a taxa fotossintética líquida, que foi menor nas plantas expostas à deriva dos herbicidas (FIGURAS 10 e 11). Cloroplastos com presença de grãos de amido não desempenham adequadamente seu papel na fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Por consequência do mecanismo de ação do herbicida carfentrazone-ethyl, ocorre a peroxidação de lipídeos e consequente degeneração das membranas plasmáticas das células de plantas sensíveis expostas a esse herbicida (SILVA; SILVA, 2012). Assim, a presença de peroxissomos em plantas do clone G-33 expostas à aplicação de carfentrazone-ethyl reforça a maior sensibilidade desse clone ao supracitado herbicida, já que os peroxissomos são organelas responsáveis pela produção das peroxidases, que são enzimas ligadas à peroxidação de lipídeos (TAIZ; ZEIGER, 2013). Adicionalmente, a desorganização dos tilacoides em plantas expostas aos herbicidas pode estar associada à peroxidação de suas membranas. E isso pode ter sido responsável pela redução da taxa fotossintética líquida nas plantas do clone G-33 expostas ao carfentrazone-ethyl (FIGURAS 10b e 11b), uma vez que as membranas dos tilacoides apresentam grande diversidade de proteínas, conhecidas como proteínas integrais de membrana, que são essenciais à fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2013).

4.1.2. Fitointoxicação, altura total e massa seca da parte aérea

Houve interação significativa entre clone e tratamento herbicida para as avaliações do percentual de fitointoxicação, altura total e massa seca da parte aérea (FIGURA 12). Plantas dos dois clones apresentaram maior intoxicação quando expostas a subdoses dos herbicidas em mistura (FIGURA 12a). Em todos os tratamentos com herbicida o clone G-33 apresentou maior porcentagem de intoxicação que o clone G-21 (FIGURA 12a).

Em relação ao crescimento em altura e produção de matéria seca da parte aérea, as plantas do clone G-33 apresentaram menor altura e menor massa seca quando submetidas à deriva da mistura de carfentrazone-ethyl e glyphosate (FIGURAS 12b-c). Já o clone G-21 apresentou menor massa da parte aérea apenas quando submetido às subdoses de glyphosate e da mistura dos dois herbicidas (FIGURAS 12b-c). Com a aplicação das subdoses de carfentrazone-ethyl e da mistura herbicida, o clone G-33

apresentou menor altura e menor produção de matéria seca que o clone G-21 (FIGURA 12).

Todas as variáveis estudadas para determinar a tolerância dos clones aos herbicidas estão correlacionadas entre si (TABELA 1). A intoxicação causada pelas subdoses dos herbicidas nos dois clones afetou negativamente a altura total, a produção de massa seca da parte aérea e a taxa fotossintética líquida (TABELA 1).

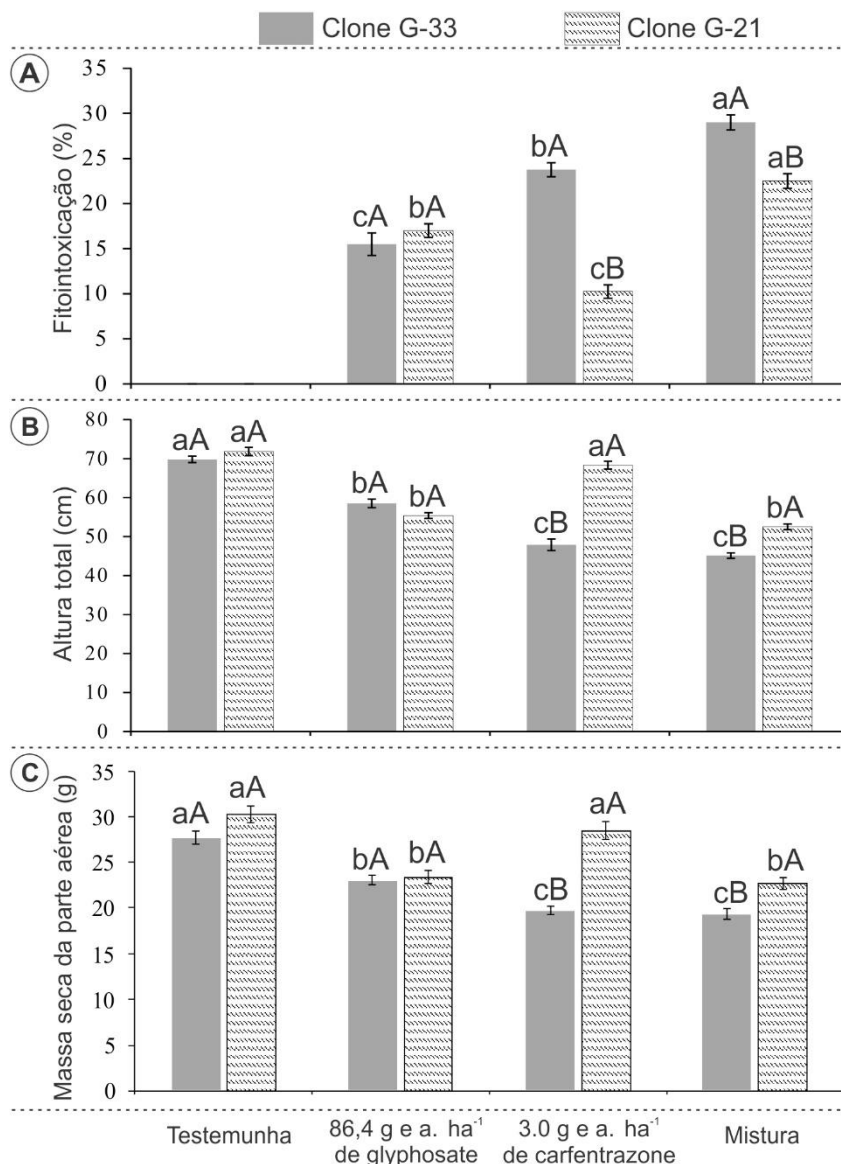
Tabela 1 - Análise de correlação entre as variáveis estudadas para determinar a tolerância dos clones aos herbicidas

Clone G-21			
	Altura total	Massa seca parte aérea	Taxa fotossintética líquida
Fitointoxicação	- 0,68**	- 0,65**	- 0,70**
Taxa fotossintética líquida	0,92**	0,97**	-
Clone G-33			
	Altura total	Massa seca parte aérea	Taxa fotossintética líquida
Fitointoxicação	- 0,96**	- 0,90**	- 0,94**
Taxa fotossintética líquida	0,96**	0,98**	-

Valores dos coeficientes de correlação de Pearson (r). **Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

Figura 12 - Fitointoxicação (A), altura total (B) e massa seca da parte aérea (C) 23 dias após aplicação dos herbicidas. Letras minúsculas comparam as médias dentro de um mesmo clone, enquanto que as maiúsculas dentro do mesmo tratamento herbicida. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras = erro padrão da média. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

Os resultados de fitointoxicação, crescimento em altura e produção de matéria seca da parte aérea, associados às imagens dos sintomas de intoxicação indicam maior sensibilidade do clone G-33 ao herbicida carfentrazone-ethyl quando comparado ao clone G-21. Tal fato pode ser atribuído à menor absorção e/ou translocação desse herbicida para a parte apical da copa no clone G-21.

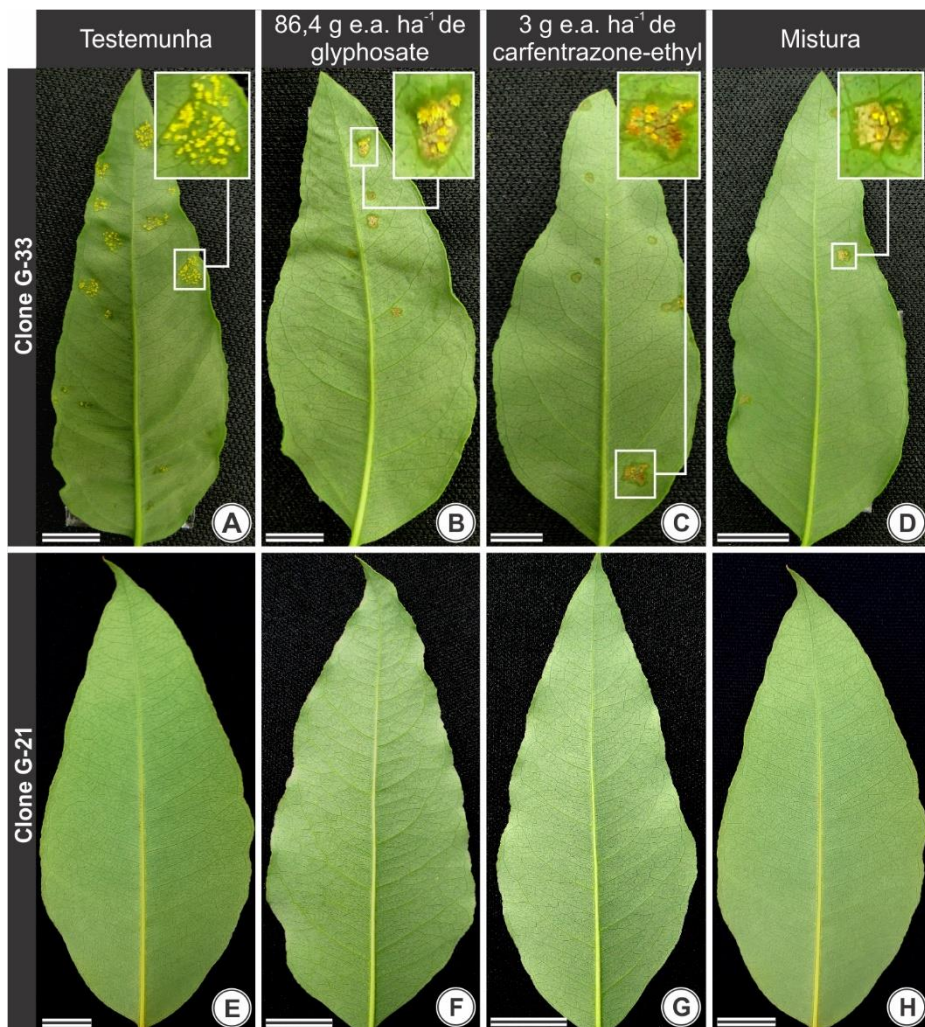
Absorção e translocação diferencial de carfentrazone-ethyl é comum entre espécies ou genótipos. Em plantas de *Glycine max* e *Abutilon theophrasti*, a translocação de carfentrazone-ethyl é 12 e 5 vezes maior, respectivamente, quando comparada a *Zea mays* (THOMPSON; NISSEN, 2000). Tolerância diferencial entre genótipos de eucalipto submetidos à deriva de herbicidas também já foi reportada na literatura por Tuffi-Santos *et al.* (2007) e Machado *et al.* (2009).

4.2. Severidade da ferrugem e histopatologia da interação *Puccinia psidii* X *Eucalyptus grandis*

A aplicação dos herbicidas não alterou o nível de resistência do clone G-21 à ferrugem. As plantas desse clone não manifestaram sintomas de infecção à *Puccinia psidii* (FIGURAS 13e-h). Entretanto, plantas do clone suscetível (G-33) expostas aos herbicidas apresentaram pústulas com pontos secos (detalhe), aparentemente com produção reduzida de esporos, sobretudo aquelas sujeitas à subdose isolada de carfentrazone-ethyl e à mistura dos dois herbicidas, comparadas às plantas testemunha (FIGURAS 13a-d).

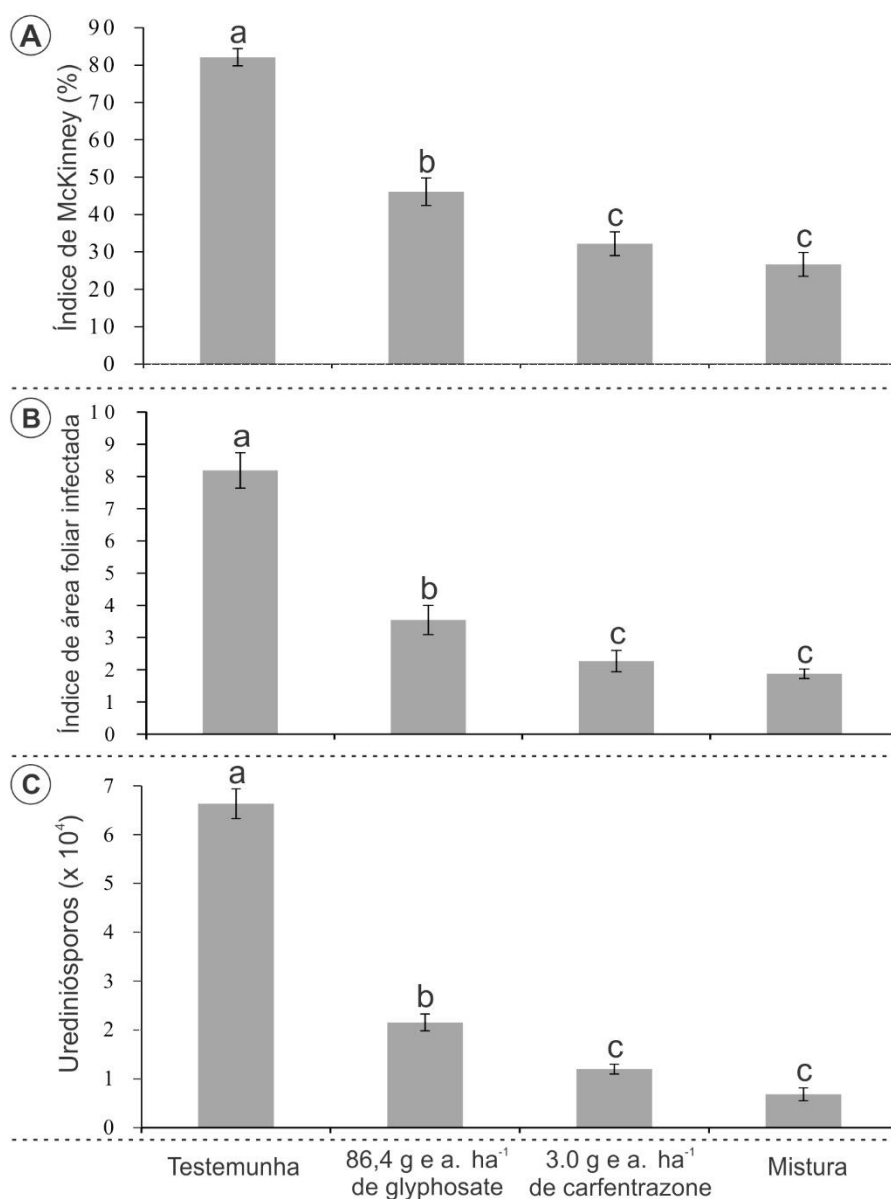
Plantas do clone G-33, previamente expostas à deriva dos herbicidas, apresentaram menor índice de incidência da doença (FIGURA 14a), menor índice médio de área foliar infectada (FIGURA 14b) e menor número médio de uredinióporos produzidos (FIGURA 14c). A aplicação da mistura dos herbicidas foi a que mais contribuiu para a redução da severidade, seguida pelas subdoses isoladas de carfentrazone e glyphosate (FIGURAS 14a-c).

Figura 13 - Espectro de infecção de *Puccinia psidii* na face abaxial das folhas de clones de *Eucalyptus grandis* 21 dias após inoculação. **A**. Pústulas bem formadas com grande produção de esporos. **B-D**. Folhas de plantas expostas aos herbicidas: detalhe evidencia pústulas com pontos secos, aparentemente com produção reduzida de urediniósporos. **E-H**. Folhas do clone resistente sem presença de infecção. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

Figura 14 - Severidade da ferrugem no Clone G-33, suscetível a *Puccinia psidii*. **A.** Índice de McKinney. **B.** Índice médio de área foliar infectada. **C.** Número médio de urediniósporos. Médias justapostas seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras = erro padrão da média. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl.



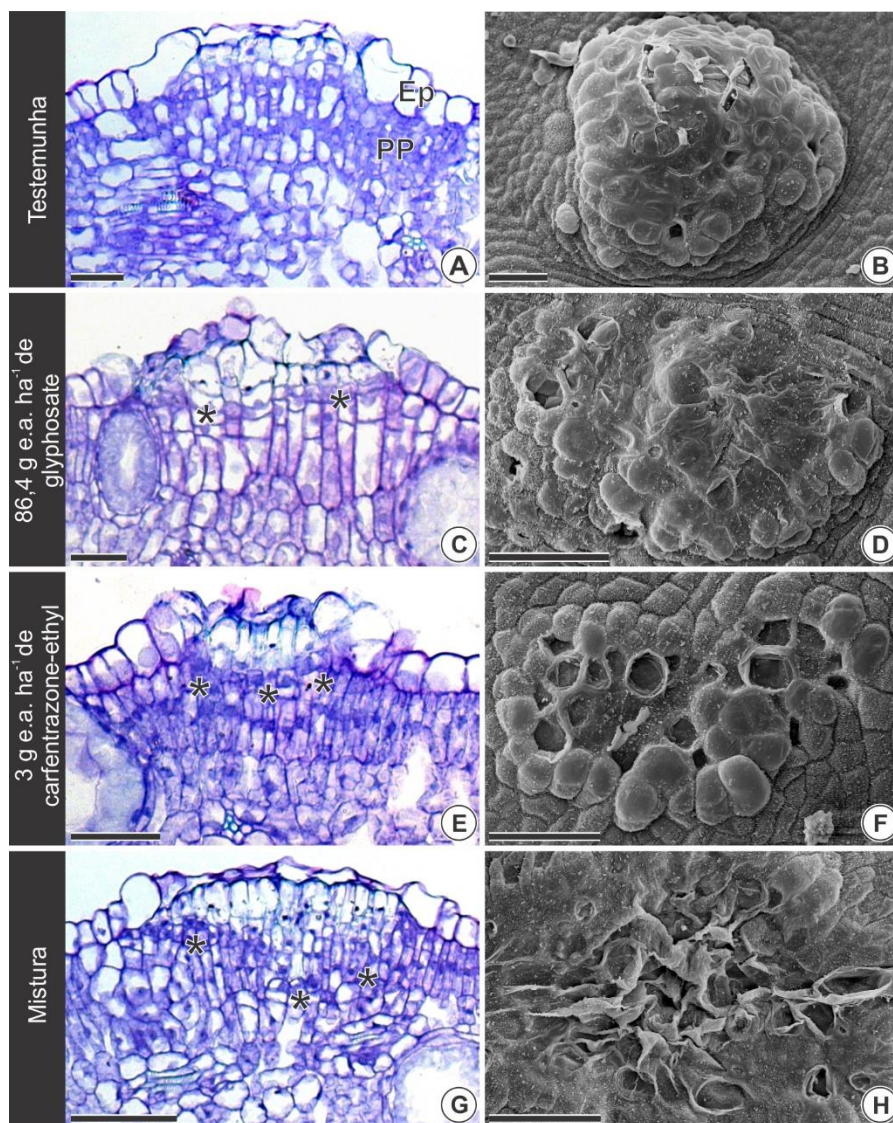
Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

No estudo da histopatologia da interação patógeno-hospedeiro, aos seis dias após inoculação (DAI), quando as pústulas no clone G-33 estavam sendo formadas, nota-se que nas plantas que não receberam deriva dos herbicidas ocorre uma projeção da epiderme, formando uma protuberância (pré-pústula) bastante evidente (FIGURAS 15a-b). Essa protuberância é formada em razão do crescimento das hifas fúngicas abaixo da epiderme. Entretanto, nas plantas expostas à deriva, tanto em corte transversal como também em vista superficial, essa projeção não é tão pronunciada (FIGURAS 15c-h). Ainda nas plantas expostas aos herbicidas, logo abaixo do ponto de infecção, ocorrem camadas de células que estão em intensa divisão celular (FIGURAS 15c, e, g).

Aos 12 DAI, as pústulas já estavam completamente formadas, observando-se a ruptura da cutícula e exposição da massa de urediniosporos (FIGURA 16). Nas plantas não submetidas à aplicação dos herbicidas, as pústulas são grandes e com acentuada produção de esporos (FIGURAS 16a-b). Porém, em plantas expostas à deriva dos herbicidas, observou-se que a colonização não foi bem-sucedida como nas plantas testemunha. As pústulas das plantas previamente expostas aos herbicidas são menores, com produção reduzida (FIGURAS 16c-f) ou com nenhuma produção de esporos (FIGURAS 16g-h), comparada às pústulas das plantas testemunha. Além disso, nessa região de infecção, as células do parênquima paliádico foram alteradas, e nas plantas expostas à mistura dos dois herbicidas, essas células estão aparentemente mortas (FIGURA 16g).

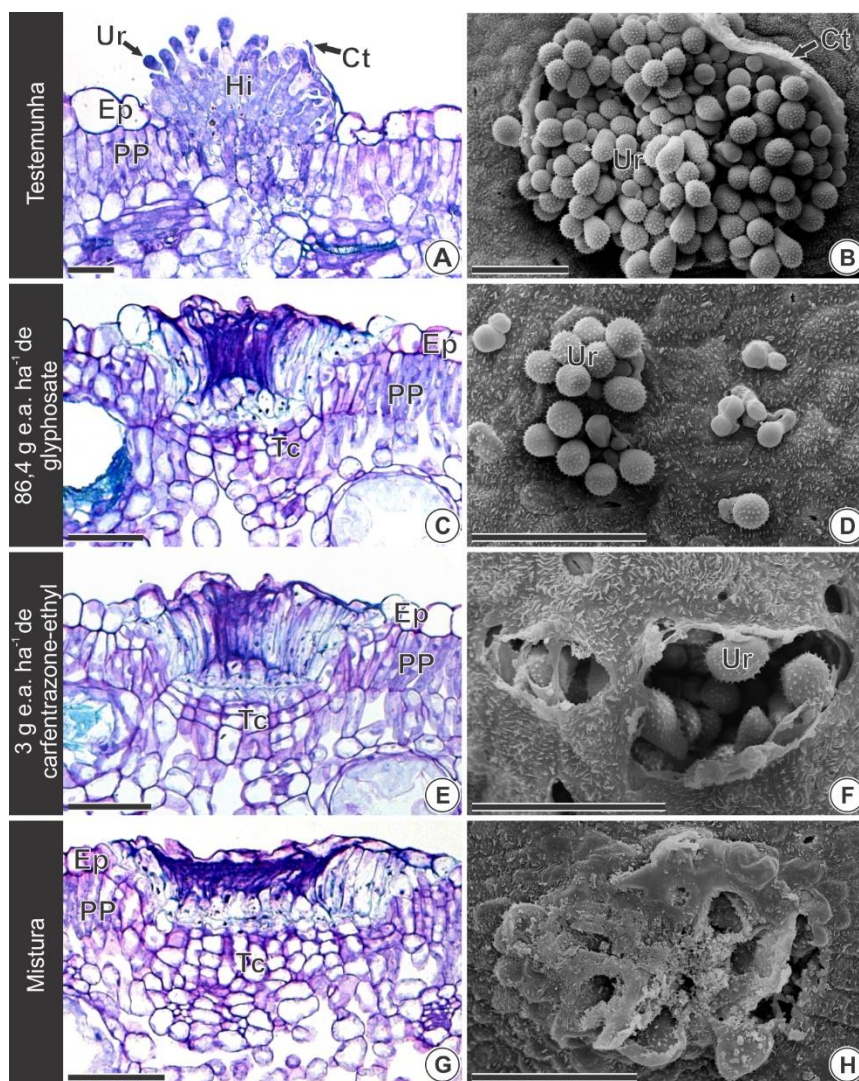
Em corte transversal, nota-se que nas plantas expostas à deriva dos herbicidas ocorreu formação de tecido de compartimentalização (FIGURAS 16c, e, g). Nas plantas tratadas com as subdoses de glyphosate e carfentrazone-ethyl, aplicadas de forma isoladas, esse tecido apresenta duas camadas (FIGURAS 16c, e), enquanto que em plantas expostas à subdose em mistura o tecido de compartimentalização é composto por três ou mais camadas de células (FIGURA 16g). A formação desse tecido é uma evidência do não sucesso da infecção, pois a região externa a esse tecido, considerada como tecido morto, é isolada do restante da folha.

Figura 15 - Microscopias de luz e eletrônica de varredura. Efeito da deriva dos herbicidas na formação das pústulas 6 dias após a inoculação de *Puccinia psidii* em plantas do clone G-33. **A-B**. Pré-pústulas grandes. **C, E e G**. *Ocorrência de divisão celular na região abaixo da infecção (asteriscos). **D e F**. Pré-pústula com desenvolvimento reduzido. **H**. Pré-pústula má-formada (sem produção de esporos). Abreviações: Ep - epiderme; PP - parênquima paliçádico; Hi - hifas. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl. Barras = 50 µm.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

Figura 16 - Microscopias de luz e eletrônica de varredura. Efeito da deriva dos herbicidas nas pústulas 12 dias após a inoculação de *Puccinia psidii* em plantas do clone G-33. **A-B.** Pústulas com alta produção de urediniósporos (Ur). **C e E.** Tecido de compartimentalização (Tc) com duas camadas de células. **D e F.** Pústulas com produção reduzida de esporos. **G.** Tecido de compartimentalização com três camadas. **H.** Pústula seca (sem produção de urediniósporos). Abreviações: Ep - epiderme; PP - parênquima paliçádico; Hi - hifas. Mistura = 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl. Barras = 50 µm.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

Embora a formação do tecido de compartimentalização seja uma estratégia comum em plantas para isolar tecido vivo de tecido morto (DICKSON, 2000), aplicações de glyphosate em doses baixas, como a utilizada no presente trabalho, estimula a divisão celular (MARC *et al.*, 2002). Dessa forma, nas plantas expostas a esse herbicida, a formação do tecido de expansão pode ter sido estimulada antes da morte de tecidos hospedeiros decorrente do insucesso na colonização, o que certamente dificultou o processo de colonização, já que o tecido de compartimentalização limita o crescimento de hifas fúngicas (STANGARLIN *et al.*, 2011).

A alta correlação entre a fitointoxicação causada pela deriva dos herbicidas e a taxa fotossintética líquida com os parâmetros avaliados para caracterizar a severidade da ferrugem (TABELA 2), reforça a influência da ação herbicida na redução da severidade da ferrugem no clone suscetível à ferrugem.

Tabela 2 - Análise de correlação entre as variáveis estudadas para determinar a tolerância aos herbicidas e as variáveis características da severidade da ferrugem do eucalipto

Ação herbicida	Severidade da ferrugem		
	I _{Mc}	I _{afi}	NMUP
Fitointoxicação	- 0,96**	- 0,92**	- 0,97**
Taxa fotossintética líquida	0,95**	0,94**	0,93**

Valores dos coeficientes de correlação de Pearson (r). **Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t. I_{Mc} = Índice de McKinney; I_{afi} = Índice de área foliar infectada; NMUP = Número médio de urediniosporos produzidos.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

Ao reduzir a taxa fotossintética líquida, a ação de herbicidas como o glyphosate, também afeta a produção de açúcares, aminoácidos e proteínas (MACHADO *et al.*, 2010; LANGARO *et al.*, 2014). Durante o processo de colonização, os patógenos nutrem-se desses metabólitos oriundos da fotossíntese para crescer e reproduzir (BEDENDO, 2011). Dessa forma, a

redução da taxa fotossintética nas plantas expostas aos herbicidas pode ter tornado tais plantas menos propensas ao ataque de *Puccinia psidii*, e, conseqüentemente, levou à redução da severidade da ferrugem. Além disso, os herbicidas podem ter apresentado efeito deletério direto sobre *Puccinia psidii*.

Apesar do herbicida glyphosate possuir efeito tóxico sobre as plantas de eucalipto, a ação inibitória desse herbicida sobre a germinação e crescimento *in vitro* de fungos já foi estudada e relatada em diversos estudos (LARSON *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2008; ROSA *et al.*, 2010; TUFFI-SANTOS *et al.*, 2011; SAMAC; FOSTER-HARTNETT, 2012). Esse efeito inibitório causado pelo glyphosate, possivelmente está relacionado com seu mecanismo de ação. Ao inibir a síntese da enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato (EPSP), o glyphosate afeta a síntese dos aminoácidos aromáticos triptofano, fenilalanina e tirosina (JAWORSKI, 1972). Tais aminoácidos são essenciais para o crescimento micelial em fungos (ROSA *et al.*, 2010). Além disso, alguns fungos e bactérias também possuem em seu metabolismo a rota do ácido chiquímico (RICHARDS *et al.*, 2006). Larson *et al.* (2006) constataram que o glyphosate inibe o crescimento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*, fungos causadores do amarelão e podridão da raiz, respectivamente em plantas de beterraba (*Beta* sp.).

Em relação ao herbicida carfentrazone-ethyl, as espécies reativas de oxigênio formadas nas plantas, em função da ação desse herbicida, também são compostos importantes na defesa de plantas aos patógenos, uma vez que fazem parte dos mecanismos bioquímicos pós-formados (STANGARLIN *et al.*, 2011). A presença de grande quantidade de peroxissomos em plantas expostas à deriva de carfentrazone-ethyl (FIGURA 8d) também pode ser forte indício de contribuição desse herbicida para redução da severidade da ferrugem.

Os peroxissomos são organelas responsáveis pela síntese das peroxidases (TAIZ; ZEIGER, 2013). Embora essas enzimas possuam efeitos deletérios sobre as plantas de eucalipto, através da degeneração das membranas plasmáticas (SILVA; SILVA, 2012), as peroxidases também são enzimas ligadas ao mecanismo de defesa das plantas aos patógenos.

Portanto, podem ter apresentado efeitos deletérios às hifas fúngicas também (STANGARLIN *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2009). Além disso, a formação rápida de pontos necróticos decorrentes da ação de carfentrazone-ethyl pode contribuir para redução da infecção de *Puccinia psidii*, já que este é um fungo biotrófico que, obrigatoriamente, necessita de tecido hospedeiro vivo para colonizar e reproduzir (ALFENAS *et al.*, 2009).

Os resultados do presente trabalho justificam e demonstram a importância de mais estudos sobre a interação herbicida *versus* patógenos, para avanços no manejo fitossanitário de forma integrada, principalmente sobre o enfoque de alterações metabólicas e/ou fisiológicas decorrentes do uso desses agrotóxicos. Ressalta-se que a maioria das substâncias ligadas ao mecanismo de defesa bioquímico das plantas é oriunda do metabolismo secundário, que é direta ou indiretamente afetado quando do uso de herbicidas nos cultivos.

5. CONCLUSÃO

Os herbicidas apresentam efeito sinérgico, pois a mistura de 86,4 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate + 3,0 g e.a. ha⁻¹ de carfentrazone-ethyl provoca maior fitointoxicação nas plantas de eucalipto. O clone mais sensível à aplicação herbicida foi o G-33. A subdose isolada de carfentrazone-ethyl não afeta o crescimento e desenvolvimento do clone G-21.

A deriva herbicida causa erosão de ceras epicuticulares, degeneração de células epidérmicas e parenquimáticas, acúmulo de grãos de amido nos cloroplastos e desorganização dos tilacoides de plantas de eucalipto. O carfentrazone-ethyl estimula a formação de peroxissomos em plantas expostas à deriva desse herbicida.

A deriva dos herbicidas reduz o rendimento efetivo do FSII, a taxa fotossintética líquida e a condutância estomática dos dois clones de eucalipto, com exceção apenas para a subdose isolada de carfentrazone-ethyl no clone G-21.

Plantas de eucalipto previamente expostas aos herbicidas apresentam pústulas com má-formação e com nenhuma ou produção reduzida de urediniósporos. Além de apresentarem tecido de compartimentalização, limitando a colonização de *Puccinia Psidii*.

A deriva dos herbicidas glyphosate e carfentrazone-ethyl, aplicados de forma isolada ou em mistura, não altera o nível de resistência do clone resistente à ferrugem (G-21). Porém, reduz a severidade da doença nas plantas do clone suscetível (G-33), sobretudo quando usados em mistura

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009, 500p.

ALTIERE, M. A. **Agroecologia**: bases científicas para una agricultura sustentable, 1999, 325p.

ALTINOK, H. H. *Fusarium* Species Isolated from Common Weeds in Eggplant Fields and Symptomless Hosts of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* in Turkey. **Journal Phytopathology**, v. 161, p. 335–340, 2013.

AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo de Relações Patógeno-Hospedeiro; in: Amorim, L; Rezende, J. A. M.; Bergamin-Filho, A. **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011, 704p.

BABIKER, E. M.; HULBERT, S. H.; SCHROEDER, K. L.; PAULITZ, T. C. Optimum Timing of Preplant Applications of Glyphosate to Manage Rhizoctonia Root Rot in Barley. **Plant Disease**, v. 95, n. 3, p. 304-310, 2011.

BECKIE, H. J. Herbicide-resistant weed management: focus on glyphosate. **Pest Management Science**, v. 67, p. 1037-1048, 2011.

BEDENDO, I. P. Classificação das doenças – Ferrugens; in: Amorim, L; Rezende, J. A. M. & Bergamin-Filho, A. **Manual de Fitopatologia**, 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011, 704p.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. 3.ed. Rocjville: American Society of Plant Physiologists, 2000, 1367p.

CARNEGIE, A. J.; LIDBETTER, J. R. Rapidly expanding host range for *Puccinia psidii* sensu lato in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 41, p. 13-29, 2012.

COOKE, B. M. Disease assessment and yield loss. In: **The Epidemiology of Plant Diseases**. COOKE, B. M.; GARETH-JONES, D.; KAYE, B. (Eds.) Second edition. The Netherlands: Springer, 2006, 64p.

COSTA, A. C. PTUFFI, R.; COSTA, N. V.; PEREIRA, M. R. R.; MARTINS, D. Efeito da deriva simulada de glyphosate em diferentes partes da planta de *Eucalyptus grandis*. **Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1663-1672, 2012.

DICKSON, W. C. 2000. **Integrative plant anatomy**. San Diego. HP Harcourt. Academic Press. 533p.

DING, W.; REDDY, K. N.; ZABLOTOWICZ, R. M.; BELLALOU, N.; ARNOLD-BRUNS, H. Physiological responses of glyphosate-resistant and glyphosate-sensitive soybean to aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate. **Chemosphere**, v. 83, p. 593–598, 2011.

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

EGAN, J. F.; BOHNENBLUST, E.; GOSLEE, S.; MORTENSEN, D.; TOOKER, J. Herbicide drift can affect plant and arthropod communities. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 185, p. 77-87, 2014.

Forest Stewardship Council (FSC). **FSC List of 'highly hazardous' pesticides**, 2015.

FRANÇA, A. C.; FREITAS, M. A. M.; FIALHO, C. M. T.; SILVA, A. A.; REIS, M. R.; GALON, L.; VICTORIA-FILHO, R. Crescimento de cultivares de café arábica submetidos a doses do glyphosate. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 599-607, 2010.

GLEN, M., ALFENAS, A. C., ZAUZA, E. A. V., WINGFIELD, M. J.; MOHAMMED, C. *Puccinia psidii*: A threat to the Australian environment and economy - A review. **Australasian Plant Pathology**, v. 36, p. 1-16, 2007.

GONÇALVES, R. M.; MEIRELLES, W. F.; FIGUEIREDO, J. E. F.; BALBI-PEÑA, M. I.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. *Digitaria horizontalis* and *D. insularis* as alternative hosts for *Pantoea ananatis* in Brazilian maize fields. **Journal of Plant Pathology**, v. 97, n. 1, p. 177-181, 2015.

GREEN, J. M. The benefits of herbicide-resistant crops. **Management Science**, v. 68, p. 1323-1331, 2012.

GUSMÃO, G. A.; NETO, R. M. R.; YAMASHITA, O. M. Deriva simulada de glyphosate em plantas jovens de jenipapo (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 10, n. 1, p. 13-19, 2011.

GUTIÉRREZ, S.; MICHALAKIS, Y.; VAN-MUNSTER, M.; BLANC, S. Plant feeding by insect vectors can affect life cycle, population genetics and evolution of plant viruses. **Functional Ecology**, v. 27, p. 610-622, 2013.

HANSON, B.; FISCHER, A.; SHRESTHA, A.; JASIENIUK, M.; PEACHEY, E. D.; BOYDSTON, R.; MILLER, T.; AL-KHATIB, K. Selection Pressure, Shifting Populations, and Herbicide Resistance and Tolerance. **Agriculture and Natural Resources**. ANR Publication 8493, 2013, 6p.

HECKMAN, N. L.; ELTHON, T. E.; HORST, G. L.; GAUSSOIN, R. E. Influence of Trinexapac-Ethyl on Respiration of Isolated Wheat Mitochondria. **Crop Science**, v. 42, p. 423–427, 2002.

JAWORSKI, E. G. Mode of action of N-phosphonomethylglycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 20, n. 6, p. 1195-1198, 1972.

JERBA, V. F.; RODELLA, R. A.; FURTADO, E. L. Relationship between bean leaf structure and the *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli* preinfection. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 3, p. 217-223, 2005.

JUNGHANS, D. T., ALFENAS, A. C., BROMMONSCHENKEL, S. H., ODA, S., MELLO, E. J.; GRATTAPAGLIA, D. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *Eucalyptus*: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 175-180, 2003a.

JUNGHANS, D. T.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A. Escala de notas para quantificação da ferrugem em *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 184-188, 2003b.

KANG, Z.; BUCHENAUER, H. Ultrastructural and immunocytochemical investigation of pathogen development and host responses in resistant and susceptible wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, p. 255-268, 2000.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

KAWANISHI, T., UEMATSU, S., KAKISHIMA, M., KAGIWADA, S., HAMAMOTO, H., HORIE, H.; NAMBA, S. First report of rust disease on ohia and the causal fungus, *Puccinia psidii*, in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 75, p. 428-431, 2009.

KUMAR, V.; JHA, P. Control of Volunteer Glyphosate-Resistant Canola in Glyphosate-Resistant Sugar Beet. **Weed Technology**, v. 29, n. 1, p. 93-100, 2015.

LANGARO, A. C.; NOHATTO, M. A.; PERBONI, L. T.; TAROUÇO, C. P.; AGOSTINETTO, D. Alterações fisiológicas na cultura do tomateiro devido à deriva simulada de herbicidas. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 13, n. 1, p. 40-46, 2014.

LARSON, R. L.; HILL, A. L. FENWICK, A.; KNISS, A. R.; HANSON, L. E.; MILLER, S. D. Influence of glyphosate on *Rhizoctonia* and *Fusarium* root rot in sugar beet. **Pest Management Science**, v. 62, p. 1182-1192, 2006.

MACHADO, A. F. L.; FERREIRA, L. R.; TUFFI-SANTOS, L. D. T.; SANTOS, J. B.; FERREIRA, F. A.; VIANA, R. G. Absorption, Translocation and Radicular Glyphosate Exudation in *Eucalyptus* sp. Clones. **Planta Daninha**, v. 27, n. 3, p. 549-554, 2009.

MACHADO, A. F. L.; FERREIRA, L. R.; TUFFI-SANTOS, L. D.; FERREIRA, F. A.; VIANA, R. G.; MACHADO, M. S.; FREITAS, F. C. L. Eficiência fotossintética e uso da água em plantas de eucalipto pulverizadas com glyphosate. **Planta daninha**, v. 28 n. 2, p. 319-327, 2010.

MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; BOULBEN, S.; HUREAU, D.; DURAND, G.; BELLE, R. Pesticide Roundup Provokes Cell Division Dysfunction at the Level of CDK1/Cyclin B Activation. **Chemical Research in Toxicology**, v. 15, n. 3, p. 326-331, 2002.

MAUCK, K. E.; SMYERS, E.; MORAES, C. M.; MESCHER, M. C. Virus infection influences host plant interactions with non-vector herbivores and predators. **Functional Ecology**, v. 29, p. 662-673, 2015.

McCULLOUGH, P. E.; JOHNSTON, C. R.; REED, T. V.; YU, J. Indaziflam Enhances Buckhorn Plantain (*Plantago lanceolata*) Control from Postemergence Herbicides. **Weed Technology**, v. 29, n. 1, p. 147-153, 2015.

McKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v. 26, p. 195-217, 1923.

McTAGGART, A. R.; ROUX, J.; GRANADOS, G. M.; GAFUR, A.; TARRIGAN, M.; SANTHAKUMAR, P.; WINGFIELD, J. M. Rust (*Puccinia psidii*) recorded in Indonesia poses a threat to forests and forestry in South-East Asia. **Australasian Plant Pathology**, v. 45, n. 1, p. 83-89, 2016.

MELLANO, V. Rust on Myrtle Found in San Diego County. **Retail Nursery Newsletter**, v.1, n. 6, p. 3, 2006.

NEVE, P.; DIGGLE, A. J.; SMITH, F. P.; POWLES, S. B. Simulating evolution of glyphosate resistance in *Lolium rigidum* II: past, present and future glyphosate use in Australian cropping. **Weed Research**, v. 43, p. 418-427, 2003.

NORSWORTHY, J. K.; RIAR, D.; JHA, P.; SCOTT, R. C. Confirmation, Control, and Physiology of Glyphosate-Resistant Giant Ragweed (*Ambrosia trifida*) in Arkansas. **Weed Technology**, v. 25, n. 3, p. 430-435, 2011.

NTIDI, K. N.; FOURIE, H.; MCDONALD, H. A.; WAELE, D.; MIENIE, C. M. S. Plant-parasitic nematodes associated with weeds in subsistence agriculture in South Africa. **Nematology**, v. 14, n.7, p. 875-887, 2012.

O'BRIEN, P. P. & MCCULLY, M. E. **The study of plants structure principles and select methods**. Termarcarphi Pty. Ltda, 1981, 45p.

OLIVEIRA, A. C. Análise conjunta de experimentos em blocos incompletos com alguns tratamentos comuns – Análise intrablocos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n. 11, p. 1255-1262, 1993.

PAZ-LIMA, M. L.; LOPES, C. A.; CAFÉ-FILHO, A. C. Stomatal patterns of *Capsicum* genotypes resistant or susceptible to *Oidiopsis haplophylli*. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 25-29, 2010.

PEREIRA, C. S.; RODRIGUES, F. A.; CARRÉ-MISSIO, V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ZAMBOLIM, L. Effect of foliar application of silicon on soybean resistance against soybean rust and on the activity of defense enzymes. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. 164-170, 2009.

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

RAWLINSON, C. J.; MUTHYALU, G.; TURNER, R. H. Effect of herbicides on epicuticular wax of winter oilseed rape (*Brassica napus*) and infection by *Pyrenopeziza brassicae*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 71, n. 3, p. 441-451, 1978.

REINA-PINTO, J. J.; YEPHREMOV, A. Surface lipids and plant defenses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 540-549, 2009.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 208- 212, 1963.

RICHARDS, T. A.; DACKS, J. B.; CAMPBELL, S. A.; BLANCHARD, J. L.; FOSTER, P. G.; McLEOD, R.; ROBERTS, C. W. Evolutionary Origins of the Eukaryotic Shikimate Pathway: Gene Fusions, Horizontal Gene Transfer, and Endosymbiotic Replacements. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 9, p. 1517–1531, 2006.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de Herbicidas**. 6. ed. Londrina, PR, 2011. 697p.

ROSA, D. D.; BASSETO, M. A.; CAVARIANI, C.; FURTADO, E. L. Effect of herbicides on phytopathogenic agentes. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 379-383, 2010.

RUIZ, R. A. R.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; VALE, F. X. R. R. D. Influência de temperatura, do tempo de molhamento foliar, fotoperíodo e da intensidade de luz sobre a infecção de *Puccinia psidii* em eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, p. 55-61, 1989.

SAMAC, D. S.; FOSTER-HARTNETT, D. Effect of Glyphosate Application on Foliar Diseases in Glyphosate-Tolerant Alfalfa. **Plant Disease**, v. 96, n. 8, p. 1104-1110, 2012.

SANTOS, A. S.; TUFFI-SANTOS, L. D.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; TANAKA, F. A. O.; SILVA, L. F.; SANTOS JÚNIOR, A. Influence of shading on the leaf morphoanatomy and tolerance to glyphosate in *Commelina benghalensis* L. and *Cyperus rotundus* L. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 2, p. 135-142, 2015.

SANYAL, D.; SHRESTHA, A. Direct Effect of Herbicides on Plant Pathogens and Disease Development in Various Cropping Systems. **Weed Science**, v. 56, n. 1, 155-160, 2008.

SHANER, D. L.; LINDENMEYER, R. B.; OSTLIE, M. H. What have the mechanisms of resistance to glyphosate taught us? **Management Science**, v. 68, p. 3-9, 2012.

SILVA, A. A.; SILVA, J. F. **Tópicos em Manejo de Plantas Daninhas**. 3ª Edição, UFV, Viçosa, MG, 2012, 347p.

Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT). **Herbicidas registrados para a cultura do eucalipto**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 05 jan. 2016.

SOARES, R. M.; GAZZIERO, D. L. P.; MORITA, D. A. S. CILIATO, M. L.; FLAUSINO, A. M.; SANTOS, L. C. M.; JANEGITZ, T. Glyphosate application on soybean rust control. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 43, n. 4, p.473-477, 2008.

SRIVASTAVA, L. M. **Plant growth and development**. Hormones and environment. San Diego, California: Elsevir Science, 2001, 771p.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. The plant defense against pathogens. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 5. ed. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, 2013, 918p.

TAROUCO, C. P.; AGOSTINETTO, D.; PANOZZO, L. E.; SANTOS, L. S.; VIGNOLO, G. K.; RAMOS, L. O. O. Períodos de interferência de plantas daninhas na fase inicial de crescimento do eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 9, p. 1131-1137, 2009.

THOMPSON, W. M.; NISSEN, C. J. Absorption and fate of carfentrazone-ethyl in *Zea mays*, *Glycine max*, and *Abutilon theophrasti*. **Weed Science**, v. 48, p. 15-19, 2000.

TIBURCIO, R. A. S.; FERREIRA, F. A.; PAES, F. A. S. V.; MELO, C. A. D.; MEDEIROS, W. N. Crescimento de mudas de clones de eucalipto submetidos à deriva simulada de diferentes herbicidas. **Revista Árvore**, v. 36, n. 1, p. 65-73, 2012.

TUFFI-SANTOS, L. D.; CRUZ, L. R.; SANTOS, A. S.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; SANTOS, I. T.; OLIVEIRA, A. M.; BARROS, R. E.; SANTOS, M. V.; FARIA, R. M. Phenotypic plasticity of *Neonotonia wightii* and *Pueraria phaseoloides* grown under different light intensities. **Anais Academia Brasileira Ciências**, v. 87, n. 1, p. 519-528, 2015.

TUFFI-SANTOS, L. D.; FERREIRA, L. R.; FERREIRA, F. A.; DUARTE, W. M.; TIBURCIO, R. A. S.; MACHADO, A. F. L. Intoxication of *Eucalyptus* Submitted to Different Herbicide Drift. **Planta Daninha**, v. 24, n. 3, p. 521-526, 2006.

TUFFI-SANTOS, L. D.; GRAÇA, R. N.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; MELOC, C. A. D. & MACHADO, M. S. Glyphosate reduces urediniospore development and *Puccinia psidii* disease severity on *Eucalyptus grandis*. **Pest Management Science**, v. 67, p. 876–880, 2011.

TUFFI-SANTOS, L. D.; NEVES, G. R.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A. FERREIRA, L. R. & ODA, S. Glyphosate sobre a resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) do eucalipto. **Planta Daninha**, v. 25, p. 139-147, 2007.

TUFFI-SANTOS, L. D.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; MEIRA, R. M. S. A.; FERREIRA, F. A.; TIBURCIO, R. A. S. & SILVA, E. C. F. Leaf micromorphology in the analysis of glyphosate toxicity in *Eucalyptus grandis*. **Planta daninha**, v. 27, p. 711-720, 2009.

UCHIDA, J.; ZHONG, S.; KILLGORE, E. First Report of a Rust Disease on Ohia Caused by *Puccinia psidii* in Hawaii. **Plant Disease**, v. 90, p. 524-524, 2006.

VARGAS, L.; BIANCHI, M. A.; RIZZARDI, M. A.; AGOSTINETTO, D.; DALMAGRO, T. *Conyza bonariensis* Biotypes Resistant to the Glyphosate in Southern Brazil. **Planta Daninha**, v. 25, n. 3, p. 573-578, 2007.

VARGAS, L.; SILVA, D. R. O.; AGOSTINETTO, D.; MATALLO, M. B.; SANTOS, F. M.; ALMEIDA, S. D. B.; CHAVARRIA, G.; SILVA, D. F. P. Influência de Glyphosate em Parâmetros Fisiológicos de Biótipos de *Conyza bonariensis*. **Planta Daninha**, v. 32, n. 1, p. 151-159, 2014.

WALSH, K. D.; SOLTANI, N.; SHROPSHIRE, C.; SIKKEMA, P. H. Weed Control in Soybean with Imazethapyr Applied Alone or in Tank Mix with Saflufenacil/Dimethenamid-P. **Weed Science**, v. 63, n. 1, p. 329-335, 2015.

WALSH, K. D.; SOLTANI, N.; BROWN, L. R.; SIKKEMA, P. H. Weed control with post emergence glyphosate tank mixes in glyphosate resistant soybean. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 94, n. 7, p. 1239-1244, 2014.

WERLANG, R. C.; SILVA, A. A. Glyphosate - Carfentrazone-ethyl Interaction. **Planta Daninha**, v. 20, n. 1, p. 93-102, 2002.

WYSS, G. S.; MÜLLER-SCHÄRER, H. Effects of Selected Herbicides on the Germination and Infection Process of *Puccinia lagenophora*, a Biocontrol Pathogen of *Senecio vulgaris*. **Biological Control**, v. 20, p.160-166, 2001.

XAVIER, A. A.; ALFENAS, A. C.; MATSUOKA, K.; HODGES, C. S. Infection of resistant and susceptible *Eucalyptus grandis* genotypes by urediniospores of *Puccinia psidii*. **Australasian Plant Pathology**, v. 30, p. 277-281, 2001.

XAVIER, A. A.; SILVA, A. C.; GUIMARÃES, L. M. S.; MATSUOKA, K.; HODGES, C. S.; ALFENAS, A. C. Infection process of *Puccinia psidii* in *Eucalyptus grandis* leaves of different ages. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, p. 318-325, 2015.

YAMASHITA, O. M.; GUIMARÃES, S. C. Resposta de cultivares de algodoeiro a subdoses de glyphosate. **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 627-633, 2005.

ZAUZA, E. A. V.; COUTO, M. M. F.; MAFIA, R. G. & ALFENAS, A. C. Eficiência de fungicidas sistêmicos no controle da ferrugem do *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v. 32, p. 829-835, 2008.

ZHUANG, J. Y.; WEI, S. X. Additional materials for the rust flora of Hainan Province, China. **Mycosystema**, v. 6, p. 853-860, 2011.