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

**Interações entre os herbicidas 2,4-D e glifosato: aspectos químicos,
bioquímicos e fisiológicos**

Marcelo Rodrigues Alves de Figueiredo

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

**Piracicaba
2015**

Marcelo Rodrigues Alves de Figueiredo
Engenheiro Agrônomo

Interações entre os herbicidas 2,4-D e glifosato: aspectos químicos, bioquímicos e fisiológicos

Orientador:
Prof. Dr. **PEDRO JACOB CHRISTOFFOLETI**

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

Piracicaba
2015

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

Figueiredo, Marcelo Rodrigues Alves de
Interações entre os herbicidas 2,4-D e glifosato: aspectos químicos, bioquímicos e fisiológicos / Marcelo Rodrigues Alves de Figueiredo. - - Piracicaba, 2015.
114 p. : il.

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

1. Antagonismo 2. Formulações 3. Mistura de tanque 4. Absorção e translocação de herbicidas 5. Ácido chiquímico 6. Espécies reativas de oxigênio I. Título

CDD 632.954
F475i

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

À minha família, em especial aos meus pais, Suzana e Mário Augusto, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em todos os momentos da minha vida.

À Ana Beatriz, o amor da minha vida, que sempre me ajudou e teve paciência nos momentos que eu estava me dedicando aos trabalhos e estudos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- À Deus, por todo o bem que Ele tem feito em minha vida, apesar de eu nada merecer;
- À gloriosa Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, por todo o crescimento pessoal, profissional e acadêmico proporcionado;
- Ao Professor Doutor Pedro Jacob Christoffoleti, pela orientação, amizade, confiança e oportunidades concedidas desde minha graduação;
- Ao Professor Doutor Valdemar Luiz Tornisielo do CENA/USP, pela orientação e amizade, que me permitiu utilizar o Laboratório de Ecotoxicologia, colocando a minha disposição toda sua estrutura e maquinário para realizar estudos com isótopos radioativos e quantificação de metabólitos;
- Ao Professor Doutor Lázaro Eustáquio Pereira Peres, do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ, pela orientação, conselhos e amizade. Por ter fornecido os mutantes de tomateiro para que essas pesquisas fossem realizadas, bem como por ter me permitido utilizar o Laboratório do Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal para realizar os experimentos de fisiologia e expressão gênica;
- Ao Pesquisador e Professor Doutor Wilson Tadeu Lopes da Silva, da Embrapa Instrumentação, pela disponibilidade, orientação, conselhos e amizade. Por ter colocado à minha disposição seus conhecimentos e o Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear;
- Ao Professor Doutor Ricardo Antunes Azevedo, do Departamento de Genética da ESALQ, por ter me permitido utilizar o Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas, para a quantificação de espécies reativas de oxigênio;
- Ao Professor Doutor Luís Reynaldo Ferracciú Alleoni, do Departamento de Solos da ESALQ, por ter me permitido utilizar o Laboratório de Análises Químicas para quantificar os metais presentes nas formulações comerciais de herbicida;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas concedidas na graduação e no mestrado;

- Ao programa de pós-graduação em Fitotecnia, pela sua excelência no ensino, apoio e financiamento à pesquisa;
- À Dow AgroScience, pela premiação em dinheiro obtida no programa SOW ENLIST, base financeira vital para realização deste projeto;
- À República Vira-Latas, à todos os moradores e ex-moradores, em especial pelos que me ajudaram nas inúmeras atividades práticas deste trabalho, pelos momentos de convivência e alegria neste período tão especial de minha vida que foram a graduação e o mestrado;
- Aos técnicos Carlos Alberto Dorelli e Rodrigo Floriano Pimpinato, do Laboratório de Ecotoxicologia – CENA, por toda ajuda incondicional, ensinamentos paciência e amizade prestada a todos os momentos desde que iniciei minhas pesquisas;
- Um agradecimento especial à Engenheira Química Me.^a Viviane Faria Soares, da Embrapa Instrumentação, pelos inúmeros serviços prestados e ensinamentos proporcionados relativos à Ressonância Magnética Nuclear;
- Ao Engenheiro Agrônomo Felipe Pecinatto Daltro, gerente da Dow pastagens – Brasil e o Biólogo PhD Randy Huckaba, gerente de pesquisa do programa ENLIST da Dow AgroScience no Brasil; pela confiança, oportunidades e incentivo às pesquisas realizadas neste trabalho;
- Ao Biólogo Dauri Aparecido Fadin - Compliance specialist da Dow AgroScience, pela amizade, disponibilidade e ajuda incondicional em todos os momentos em que me foi necessário;
- Às técnicas Cássia Regina Fernandes Figueiredo, do Laboratório do Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal; Me.^a Marina Colzato, do Laboratório de Análises Químicas; Dr.^a Salete Aparecida Gaziola do Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas, pela assistência e ensinamentos;
- À Bióloga Me.^a Marcela Morato Notini e ao geneticista Dr. Agustin Zsögön, por toda ajuda prestada na realização dos experimentos de fisiologia e expressão gênica;
- Ao grupo de plantas daninhas (GPD), em especial os Engenheiros Agrônomos Mes.: Caio Augusto de Castro Grossi Brunharo; Flávio Eduardo Botelhos Obara; Marcel Sereguin Cabral

de Melo, pela amizade, conselhos e companheirismo nas incansáveis horas de trabalho de estágio que enfrentamos desde o tempo da graduação;

- Ao Dr. Marcelo Nicolai e a empresa Agrocom, pela ajuda administrativa dos fundos obtidos para essa pesquisa;

- Ao grupo de funcionários do Departamento de Produção Vegetal, em especial à Luciane Aparecida Lopes Toledo, Elisabete Sarkis São João, Aparecido Donizete Serrano e Clayton Coratito;

- A todos que colaboraram direta ou indiretamente e que, por ventura, tenha me esquecido de relatar.

Muito Obrigado !

“A fé e a razão (*fides et ratio*) constituem como que as duas asas pelas quais o espírito humano se eleva para a contemplação da verdade.

Foi Deus quem colocou no coração do homem o desejo de conhecer a verdade e, em última análise, de O conhecer a Ele, para que, conhecendo-O e amando-O, possa chegar também à verdade plena sobre si próprio.”

São João Paulo II, Papa

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Interações entre herbicidas	21
2.2 Transdução de sinal induzida pelas auxinas	25
2.2.1 Auxinas e sua atuação como herbicidas	26
2.3 A rota do chiquimato e a síntese dos aminoácidos aromáticos	27
2.3.1 Glifosato e a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase.....	30
2.4 Micro-tom: organismo modelo para estudo da biologia vegetal	31
3 OBJETIVOS.....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para estudo da conformação molecular do Gli, 2,4-D e suas misturas em diferentes formulações	37
4.2 Cultivo das plantas de tomateiro e aplicação de herbicidas	38
4.3 Uso de herbicidas radiomarcados para estudos de absorção e translocação	38
4.4 Absorção de diferentes formulações de 2,4-D e Gli em plantas de tomateiro	40
4.5 Estudos de eficácia de interação entre 2,4-D e Gli em plantas de tomateiro	41
4.6 Caracterização do efeito das misturas de 2,4-D e Gli em mutantes de tomateiro	41
4.7 Aspectos da translocação dos herbicidas 2,4-D e Gli em mutantes de tomateiro	41
4.8 Ensaio histoquímico em plântulas	42
4.8.1 Expressão do gene DR5 responsivo à auxina pelo marcador β -glucuronidase (GUS) ...	42
4.8.2 Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) <i>in situ</i>	43
4.9 Quantificação do acúmulo de ácido chiquímico por cromatografia líquida (HPLC-DAD)	43
4.10 Análises estatísticas, gráficas e qualitativas	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 RMN para estudo da conformação molecular do Gli, 2,4-D e suas misturas em diferentes formulações	47
5.2 Dinâmica da absorção das diferentes formulações de 2,4-D e Gli.....	58
5.3 Interação entre a mistura de 2,4-D e Gli em plantas de Micro-Tom	63
5.4 Caracterização da eficácia dos herbicidas e suas misturas em mutantes de tomateiro.....	65

5.5 Translocação dos herbicidas 2,4-D e Gli em mutantes de tomateiro.....	67
5.6 Parâmetros bioquímicos e genéticos da interação de 2,4-D e Gli.....	74
5.6.1 Atuação do glifosato na via de sinalização de auxina no núcleo	74
5.6.2 Produção de espécies reativas de oxigênio	76
5.6.3 Acúmulo de ácido chiquímico	81
6 CONCLUSÕES	87
ANEXOS	99

RESUMO

Interações entre os herbicidas 2,4-D e glifosato: aspectos químicos, bioquímicos e fisiológicos

Na literatura existe um consenso que os herbicidas glifosato (Gli) e 2,4-D interagem antagonicamente quando aplicados em combinação. No entanto, as bases bioquímicas e fisiológicas destes antagonismos são desconhecidas. Utilizou-se espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para a caracterização de moléculas de Gli e 2,4-D em várias formulações analíticas, preparadas de maneira que os herbicidas fossem obtidos sem os ingredientes inertes das formulações comerciais. Não foram encontradas alterações significativas na conformação atômica do herbicida nos espectros de RMN entre as formulações analíticas de Gli isopropilamina, dimetilamina, potássio ou amônio; 2,4-D Dimetilamina ou colina, quando analisadas separadamente ou em mistura. Avaliando também formulações comerciais dos herbicidas, não foram encontradas diferenças significativas entre os espectros de RMN para a mistura entre Gli e 2,4-D. A formulação comercial de Gli amoníaco apresentou alterações na conformação molecular do Gli, principalmente na região P da molécula que mostrou maior deslocamento químico, mas isso foi atribuído aos maiores teores de Na encontrados nessa formulação. Aplicando-se as diferentes formulações comerciais na espécie modelo de tomate Micro-Tom (MT), foram estudados os padrões de absorção dos herbicidas. A absorção de Gli radiomarcado pelas plantas de MT foi reduzida somente para a formulação Gli sal de amônio, independentemente da presença de 2,4-D. Neste trabalho, não se observou efeito antagonico na absorção entre Gli e 2,4-D. Por meio de um ensaio fatorial para determinar o efeito antagonico dos herbicidas em plantas de MT, observou-se que a dose de maior antagonismo para 2,4-D foi: 35 g i.a. ha⁻¹ – 0,65 mM e para Gli, 70 g g i.a. ha⁻¹ – 1,7 mM. A translocação do Gli radiomarcado foi significativamente reduzida em MT, quando aplicado com 2,4-D. Experimentos utilizando o marcador molecular GUS no gene DR5 do MT, mostraram que o Gli reduz a resposta de expressão gênica pelas vias de sinalização do 2,4-D. Os ensaios de quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzidas pela atuação do 2,4-D, apresentaram menor produção na presença do Gli. O acúmulo de ácido chiquímico causado pelo Gli no MT foi maior quando aplicado sem mistura com 2,4-D. A interferência do 2,4-D na atuação do Gli foi confirmada nos mutantes insensíveis à auxina *diageotropica* (*dgt*) e *Never ripe* (*Nr*), em que a produção de EROs foi menor e a translocação do Gli foi mantida independente da aplicação com o 2,4-D. O acúmulo de ácido chiquímico na aplicação de Gli e a mistura dos herbicidas, foram semelhantes. O mutante *yellow-green2* (*yg2*), menos sensível ao Gli, apresentou menor translocação do herbicida. O acúmulo de ácido chiquímico para este mutante foi menor quando aplicado com Gli, mas na mistura de Gli + 2,4-D, a quantidade do ácido aumentou. A insensibilidade ao Gli proporcionou o reestabelecimento da produção de EROs pelo 2,4-D na aplicação da mistura dos herbicidas. Neste trabalho, em contraposição ao conhecimento atual, não se observou qualquer efeito antagonico entre Gli e 2,4-D a nível químico, mas o antagonismo ocorreu por fatores da inter-relação dos mecanismos que cada herbicida induz nos níveis fisiológicos, bioquímicos e genéticos na biologia do organismo vegetal.

Palavras-chave: Antagonismo; Formulações; Mistura de tanque; Absorção e translocação de herbicidas; Ácido chiquímico; Espécies reativas de oxigênio

ABSTRACT

2,4-D and glyphosate interactions: chemical, physiological and biochemical aspects

A consensus exists in literature that the herbicides glyphosate and 2,4-D interact antagonistically when applied in combination. However, the biochemical and physiological basis of this antagonism are unknown. It was used Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectrometry to characterize the molecules of glyphosate and 2,4-D prepared with high purity analytical compounds without the commercial formulations inert ingredients. No changes in atomic herbicide conformation were found in NMR spectra of glyphosate formulations isopropylamine, dimethylamine, potassium or ammonium and 2,4-D dimethylamine or choline, when evaluated separately or in mixture. Analysing also the commercial herbicides formulations, no differences in NMR spectra for the mixture between glyphosate and 2,4-D were found in chemical shift. The ammonium salt glyphosate formulations, presented changes in molecular conformation in P region of glyphosate showing higher chemical shift, which was attributed to higher levels of Na found in its composition. It was applied different commercial formulations in tomato cultivar Micro-Tom (MT) to study the pattern of herbicide absorption. The absorption of radiolabeled glyphosate by MT was reduced in the ammonium salt formulation, regardless of the 2,4-D's presence. In this work, no antagonistic effect in plant absorption was observed between glyphosate and 2,4-D. Factor assay was conducted using different concentrations of 2,4-D and glyphosate to determine the antagonistic effect on tomato plants. It was observed that the dose of greater antagonism to 2,4-D form 35 g a.i. ha⁻¹ - 0.65 mM and for glyphosate, 70 g a.i. ha⁻¹ - 1.7 mM. Assays using molecular reporter GUS in MT's DR5 gene, showed that the glyphosate reduces gene expression responses through signalling pathways of the 2,4-D. The absorption of radiolabeled glyphosate was significantly reduced in MT, when it was applied with 2,4-D. In trials that it was quantified production of reactive oxygen species (ROS) on MT induced by 2,4-D performance, lower production were found when 2,4-D were applied with glyphosate. The shikimic acid accumulation affected by glyphosate action in MT was higher when applied without 2,4-D mixture. The interference of 2,4-D in glyphosate's actions was confirmed in auxin insensitive mutants *diageotropica* (*dgt*) and *Never ripe* (*Nr*), which ROS production was lower. In those mutants, glyphosate translocation was maintained regardless 2,4-D application and shikimic acid accumulation between glyphosate treatment and herbicide mixture were similar. The *yellow-green2* (*yg2*) mutant was less sensitive to glyphosate, presenting low translocation to the herbicide. The shikimic acid accumulation for *yg2* mutant was lower when applied with glyphosate, but when it was treated with glyphosate + 2,4-D, the amount of acid was increased. The insensitivity of glyphosate provided reestablishment of ROS production by 2,4-D, when the mixture of herbicides were applied. In this paper it was show that, in contrast to current knowledge, there was no antagonistic effect between glyphosate and 2,4-D in chemical level, but the antagonism occurred by factors of the interrelationship of the mechanisms that each herbicide induces in the physiological, biochemical and genetic levels in the biology of the plant organism.

Keywords: Antagonism; Formulations; Tank mixture; Herbicides uptake and translocation; Shikimic acid; Reactive oxygen species

1 INTRODUÇÃO

Os herbicidas Ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e N-(fosfonometil)glicina (glifosato – Gli) desempenham papel fundamental na otimização da produção agrícola na maior parte das culturas produzidas em larga escala em todo o mundo, esses herbicidas vêm sendo amplamente aplicados na agricultura durante décadas devido à sua eficácia no controle de plantas daninhas.

Quimicamente, o herbicida 2,4-D é caracterizado por seu baixo peso molecular, uma vez que é um ácido orgânico contendo um grupo fenóxi ligado a dois cloros e a um grupo carboxílico. O 2,4-D em meio aquoso permanece na forma desprotonada por ser um ácido fraco, assim, dependendo do pH e dos componentes da solução em que está dissolvido, o herbicida fica disponível para reagir com outros elementos com carga formando conjugados menos ativos (THELEN, 1995). O Gli é um amino-fosfato análogo à glicina e sua molécula possui uma série de hidrogênios dissociáveis. Devido a essa característica química, o herbicida pode realizar facilmente trocas catiônicas com outros elementos com carga presentes em sua formulação ou na calda de pulverização, resultando em um composto com menor capacidade de ser absorvido pelas plantas (THELEN, 1995).

Ambos os herbicidas são aplicados em pós-emergência e absorvidos pelas folhas, por apresentarem características hidrofílicas, penetram por “poros polares” (WANG, 2007, DENIS et al., 2015), existentes na cutícula e são transportados na forma protonada para o interior da célula por transportadores específicos (AUX1 - auxin transporter protein 1 (KLEINE-VEHN et al., 2006) no caso das auxinas e PHT – Phosphate transporter, para o Gli (DENIS et al., 2015). No interior do simplasto, os herbicidas são transportados na forma ionizada para os diversos tecidos, acumulando-o principalmente nas raízes, caules e folhas novas (BROMILOW et al., 2015, MARTIN; EDGINGTONA, 1981).

No metabolismo da célula, o Gli atua como inibidor incompetitivo da enzima 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase (EPSPS) na via de formação dos aminoácidos essenciais aromáticos, causando distúrbios no metabolismo do carbono, necessários para produção de aminoácidos aromáticos e seus derivados (AMRHEIN et al., 1980, HERRMANN, 1995). O 2,4-D, que é uma auxina sintética, atua nos receptores Auxin Binding Protein (ABP1) e no complexo protéico Skp1-Cullin-F-box protein (SCF), sendo a proteína F-box: TIR (Transport inhibitor response) / AFB (auxin-signaling F-box). A super ativação desses receptores pela presença do herbicida altera os padrões do citoesqueleto levando a menor atividade dos lisossomos (que são reguladores do ambiente oxidativo do

citosol) (RODRIGUEZ-SERRANO et al., 2014) e promovendo a formação dos hormônios etileno e ácido Abscísico (ABA), que induzem a produção em larga escala de espécies reativas de oxigênio (EROs) (GROSSMANN, 2010). Devido ao impacto causado pela interferência dos herbicidas no metabolismo celular vegetal, os tecidos entram em processo de senescência, culminando na morte da planta como um todo.

A ação de herbicidas está relacionada às propriedades físico-químicas complexas. Esses atributos são variáveis devido à diversidade existente entre as diferentes espécies de planta e seu metabolismo, sofrendo também a interferência do ambiente. A utilização de dois ou mais herbicidas simultaneamente torna o estudo de seu efeito um processo mais complexo, uma vez que as mudanças do ambiente químico da solução podem induzir alterações radicais nas propriedades e atributos do comportamento das moléculas, tanto em seus aspectos físico-químicos, quanto em sua ação biológica ativa.

O antagonismo químico entre os herbicidas 2,4-D e Gli foi amplamente estudado nas décadas de 1980 e 1990. Nessa época, diversos trabalhos utilizando várias formulações relataram a ocorrência de antagonismo do 2,4-D na ação do Gli, principalmente no controle de gramíneas (FLINT; BARRETT, 1989; NALEWAJA, 1991; O'SULLIVAN, 1980). Em 1995, THELEN utilizando técnicas de RMN para avaliar a interação entre os 2,4-D dimetilamina e Gli propôs que os componentes catiônicos (metais e aminas), presentes nas formulações de 2,4-D, poderiam formar conjugados com menor capacidade de absorção pelas plantas, deduzindo-se assim que o antagonismo entre os dois herbicidas era relacionado às propriedades químicas da mistura.

Antagonismos referentes aos aspectos fisiológicos e bioquímicos foram, até o momento, pouco estudados. Flint e Barrett (1989), utilizando herbicidas radiomarcados reportaram redução de absorção e translocação do Gli quando aplicado com 2,4-D. Em 2000 Lym, avaliando o comportamento dos herbicidas em *Euphorbia esula*, observou uma taxa de absorção e translocação de 2,4-D três vezes maior quando aplicados com Gli, contudo, tanto a absorção, quanto a translocação do Gli foi severamente comprometida quando aplicada com 2,4-D.

O único estudo realizado nas últimas décadas avaliando parâmetros bioquímicos entre Gli e auxinas foi em 1982 (LEE), em que a presença do ácido indolacético (IAA) atenuou os efeitos fitotóxicos do herbicida. Além disso, a inibição do crescimento induzido pelo Gli também interferiu na quantidade de IAA livre, provavelmente porque o herbicida acelerava a formação de conjugados e degradação do IAA.

Nas últimas décadas, muito pouco se estudou sobre a interação química de herbicidas em mistura. Contudo, essa prática é de uso corrente em quase todos ambientes de produção agrícola e deverá ser praticada cada vez mais, principalmente com o advento de novas tecnologias que irão implantar o uso de transgênicos resistentes a múltiplos mecanismos de ação de herbicidas para cultura produzidas em larga escala em um futuro próximo. De fato, é previsto que, em poucos anos, haja o lançamento de culturas de soja e milho transgênicas resistentes a 2,4-D e Gli pelas indústrias de produção de sementes e agroquímicos. Essas tecnologias serão adotadas rapidamente pelos agricultores em todo o mundo e há uma série de preocupações sobre seus usos (WRIGHT et al., 2010), especialmente quanto aos seus efeitos na ecologia das plantas infestantes da lavoura. Assim, para que haja o bom uso dessas novas tecnologias é necessário a melhor compreensão dos aspectos químicos, fisiológicos e bioquímicos dos herbicidas que serão utilizados. Estes conhecimentos poderão ajudar a indústria, os produtores e a ciência enfrentar os numerosos e difíceis desafios que a agricultura terá futuramente, de modo a manter as novas tecnologias que, serão em breve, uma nova realidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Interações entre herbicidas

Em diversos países do mundo, a prática da mistura de produtos fitossanitários é algo comum e amplamente utilizado. A legislação brasileira, no Decreto nº 4.074/02, artigo 1º, inciso XXV, descreve o uso de misturas de tanque como um procedimento de “associação de agrotóxicos e afins no tanque do equipamento aplicador, imediatamente antes da aplicação”. As vantagens de se utilizar determinados agroquímicos aplicados em mistura são muitas, uma vez que, além de diminuir custos de produção, há grande economia de trabalho e tempo, permitindo otimização das operações na lavoura e, conseqüentemente, a redução de problemas ligados a compactação do solo. Outro importante aspecto a ser considerado é o incremento no espectro e aumento no tempo de controle das pragas incidentes nas culturas. Além disso, em alguns casos, alguns agroquímicos se misturados em pequenas quantidades proporcionam maior efeito e eficiência do que um único produto aplicado individualmente em alta concentração. A mistura também pode reduzir o impacto ambiental de certos herbicidas de alta persistência no solo, porque ao utilizar menores doses em mistura, pode-se reduzir o efeito degradante de determinadas moléculas nos ecossistemas naturais. Finalmente, as associações de produtos fitossanitários proporcionam menores chances de aparecimento de biótipos resistentes de pragas, selecionados por aplicações sucessivas de uma única molécula (HATZIOS; PENNER, 1985).

Devido à complexidade das interações químicas entre os componentes dos diferentes produtos associados, as misturas podem ser utilizadas de maneira errada, reduzindo sua eficiência original e podendo causar também impacto sobre o ambiente e a saúde humana, uma vez que sua toxicidade pode ser alterada. Mediante a essas deficiências, sobretudo a carência de informação científica sobre o resultado dos novos componentes ou características químicas que as misturas possam ter, a legislação brasileira tem se posicionado de maneira rígida e conservadora ante a prática da mistura de tanque de produtos fitossanitários.

A mistura em tanque no Brasil é tópico de grande discussão quanto a sua regularidade formal e as responsabilidades dos que a praticam. No passado, a Portaria do MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento) nº 67, de 30 de maio de 1995, regulamentou o uso de mistura, considerando-a uma prática de utilização global na agricultura e que obteve grande sucesso. Além disso, considerava a mistura de produtos fitossanitários

uma alternativa para a “redução nos custos da produção, aumento do espectro de controle de pragas, redução da contaminação ambiental e do tempo de exposição do trabalhador rural ao agrotóxico”. No entanto, em 24 de julho de 2002, a Normativa nº 46 decretou em seus artigos a revogação da Portaria de 1995 e estabeleceu, para todas as empresas detentoras do registro de agroquímicos, a “retirada das indicações de misturas em tanque dos rótulos e bulas”.

Diante desse novo Decreto, alguns pontos não ficaram bem elucidados, haja vista que no documento não existe nenhum tipo de proibição ante ao uso de mistura em tanque, podendo ser feita sob a responsabilidade do produtor. Além disso, receituários feitos por profissionais de Engenharia Agrônômica ou outros com competência para tanto, são proibidos de conter qualquer tipo de indicação de mistura que não esteja previamente indicada no rótulo ou na bula, contudo, ainda é possível a elaboração de uma receita para cada produto. Quanto às empresas detentoras dos registros, existe a possibilidade de indicar misturas em tanque prescrevendo-as em suas bulas e rótulos, realizando seu registro junto aos órgãos governamentais competentes (ANVISA, MAPA e IBAMA), como o registro de um novo produto para determinada cultura.

Existem propostas atuais para que a mistura deixe de ser um produto registrável, passando a ser apenas uma prática agrícola de faculdade do agricultor. Em 2011, um parecer publicado pela Associação Brasileira dos Defensivos Genéricos (AENDA) aponta a necessidade da criação de projetos de lei para ajustar a utilização de misturas de tanque no Brasil, permitindo assim que os profissionais competentes deem instruções não só contidas nos rótulos e bulas dos produtos aplicados, mas também baseadas em pesquisas geradas pela comunidade científica ou em seu próprio conhecimento, dando liberdade para os profissionais exercerem, em plenitude, suas funções e poderes. Ante a situação apresentada, conclui-se que uma das grandes carências da ciência das plantas daninhas é o estudo e a investigação das misturas entre herbicidas e outros produtos fitossanitários.

Os termos utilizados para descrever o comportamento de interação entre herbicidas são: antagonismo, quando um produto interfere negativamente na eficiência do outro; sinergismo, quando um produto aumenta a eficiência do outro por meio da mistura; e aditividade, que seria quando a eficiência do produto é similar ou igual à aplicação de ambos individualmente. Esses termos surgiram na farmacologia e são empregados em diversas áreas das ciências para explicar o comportamento do efeito de compostos químicos em mistura.

Morse (1978) retrata que para melhor definir a complexidade das interações entre químicos em mistura, é necessário considerar fatores que transcendem o simples conceito da ação conjunta de dois componentes que induzem a resultados melhores, piores ou

semelhantes, do que quando utilizados separadamente. Por isso, o autor menciona a necessidade de interpretar e provar os resultados de interação por meio de modelos matemáticos de referência como testes de probabilidade (Teste de Análise na Variância, Teste de Colby) e modelos gráficos de superfície.

Provar a existência de interações por meio de uma hipótese nula, quando apenas um dos componentes da mistura afeta o desenvolvimento da planta, é mais simples do que estudar moléculas em que mais de um componente da mistura é ativo, pois um elemento pode aumentar e ao mesmo tempo diminuir, o efeito de outro. Nesse sentido, o sinergismo e o antagonismo podem ocorrer simultaneamente, sendo uma condição difícil de detectar ou medir experimentalmente, uma vez que a hipótese nula torna-se complexa de definir. Assim, para definição do modelo a ser utilizado, é necessário o conhecimento dos termos inerentes ao efeito dos componentes da mistura nas plantas, de seu comportamento fisiológico e de seus mecanismos bioquímicos, relacionando-os com as metodologias de avaliação (peso, porcentagem de controle, altura, germinação, sobrevivência). Essas considerações são fundamentais, porque podem ajudar a desvendar parte do que possa ocorrer nos mecanismos fisiológicos e bioquímicos, que são diretamente afetados pelos componentes da mistura. Sem essa perspectiva, não existe nenhuma maneira de definir se os resultados encontrados no modelo conseguem explicar a existência de algum tipo de interação ou se o modelo foi utilizado inadequadamente.

Para definir os mecanismos de ação de herbicidas utilizados em misturas, Hatzios e Penner (1985) alegam que o princípio da alteração, tanto de aumento, quanto de decréscimo, na atividade de dado herbicida aplicado em conjunto com outro agroquímico, deve ser o resultado de mudanças na quantidade de herbicida na sua forma ativa, atuando no seu sítio de ação. Portanto, a ocorrência de qualquer tipo de alteração causada por outros compostos presentes na calda de aplicação pode influenciar na fitotoxicidade do herbicida, alterando seus padrões de atuação a nível estrutural e funcional do vegetal como: penetração, translocação e biotransformação. Quanto aos níveis mais básicos das estruturas vegetais, há alteração nos sites de ação bioquímicos ou fisiológicos das células. A interação entre herbicidas e outros químicos pode ocorrer tanto fora da planta quanto no seu interior, em momento anterior ou posterior ao da aplicação, uma vez que herbicidas podem interagir com químicos aplicados simultaneamente ou com moléculas residuais presentes no momento da aplicação.

O sinergismo da atividade de herbicidas quando misturados com outros agroquímicos ocorre quando há aumento da sua penetração e translocação. Assim, a eficiência de penetração dos herbicidas comerciais é potencializada modificando-se as propriedades da

calda de aplicação com o uso de adjuvantes e surfactantes (WANG; LIU, 2007), bem como com o uso de fertilizantes amoniacais, podendo ocorrer também a modificação na calda de aplicação ao se misturar inseticidas, fungicidas e outros herbicidas. Desvios nos padrões normais de biotransformação de moléculas xenobióticas podem ser ainda a causa do efeito sinérgico. Essas alterações proporcionam mudanças na metabolização dos determinados herbicidas quando aplicados em conjunto com inseticidas, fungicidas, fertilizantes e compostos antioxidantes capazes de inibir enzimas degradantes responsáveis pela metabolização do herbicida (HATZIOS; PENNER 1985).

O antagonismo da ação conjunta de herbicidas com outros compostos pode ser caracterizado em quatro categorias. O antagonismo bioquímico, em que a presença de um composto químico tem capacidade de diminuir a quantidade de herbicida que chega ao sítio de ação alvo, pode ocorrer pela redução da penetração ou do transporte e pelo aumento da inativação metabólica ou por sequestro, quando o herbicida é fisicamente removido de seu sítio de ação. O antagonismo competitivo ocorre quando o agente agonista se liga ao sítio ativo e impede a ligação do herbicida. O antagonismo fisiológico ocorre quando os modos de ação entre os herbicidas aplicados se contrapõem, isso pode ocorrer pelo aumento da ação de um herbicida mais ativo anulando a ação de outro herbicida menos ativo. Esse tipo de antagonismo também ocorre quando há o decréscimo da quantidade do herbicida menos ativo para seu estado fisiologicamente inativo. A última categoria definida pela literatura é denominada antagonismo químico, que ocorre quando o composto é colocado em mistura reagindo quimicamente com o herbicida ou alterando as propriedades físico-químicas da calda de pulverização, formando compostos menos ativos ou inativos (HATZIOS; PENNER, 1985; GREEN, 1989).

Apesar da diversidade de interações que pode haver entre herbicidas utilizados em misturas com outros agroquímicos, existe uma série de fatores que interferem na sua ocorrência. A dose do herbicida utilizada é, na maioria das vezes, o principal método de minimizar os efeitos antagônicos. Ao realizar a mistura no tanque, utilizam-se doses maiores de composto antagonizado ou doses menores para compostos que aumentam a ação fitotóxica do herbicida utilizado. Plantas de diferentes espécies também possuem, majoritariamente, diferentes respostas à interação moléculas em mistura. Em geral, as práticas de manejo preocupam-se em misturar herbicidas para aumentar o espectro de controle ou obter resultados em que a combinação entre princípios ativos seja antagônica à cultura de interesse e sinérgica ou aditiva para as plantas que se deseja obter o controle (COLBY; WOJTASZEK; WARREN, 1965).

2.2 Transdução de sinal induzida pelas auxinas

As respostas da célula às auxinas na membrana plasmática são caracterizadas por sua rápida atuação, isso ocorre pelo fato de existir nessa região um receptor químico denominado Auxin Binding Protein 1 (ABP1). Esse receptor foi encontrado pela primeira vez por Hertel et al., em 1972, nas membranas de coleóptilos de milho (*Zea mays*).

Na membrana plasmática, a ABP1 ao se ligar com as auxinas, codifica um sinal que induz a superatividade das bombas de próton presentes na membrana plasmática. As ATPsintases são responsáveis por manter o balanço de energia entre o apoplasto e simplasto celular, que uma vez ativadas, ocorrerá o acúmulo de prótons no exterior da célula levando ao decline do pH extracelular (Revisado por TROMAS et al., 2010; SAUER; KLEINE-VEHN, 2011). Este processo é de extrema importância para entender os primeiros sintomas da aplicação de auxinas em plantas, pois o desbalanço eletroquímico causado pelo influxo de H^+ induz à abertura de canais de potássio, que serão bombeados para o interior da célula. Com o aumento de K^+ , as aquaporinas (proteínas transportadora de água) são acionadas promovendo influxo de água e o consequente aumento da turgidez celular (MICHELET; BOUTRY, 1995; MAESHIMA, 2003).

A hiperpolarização causada pelo acúmulo de prótons, o apoplasto e a acidificação levam a hidratação da parede celular. Este processo, ainda não é bem entendido, mas é a base para compreender a sinalização de caráter mecânico/físico induzido pelas auxinas, em que, proteínas denominadas expansinas, são ativadas pelas altas quantidades de prótons na parede celular, flexibilizando-a e rompendo ligações não covalentes entre celulose e hemicelulose (componentes da parede celular), o que leva à insaturação de suas cadeias e consequentemente a sua maior fluidez (WOLF et al., 2012).

Diante desta situação, estudos sugerem (Revisto por MONSHAUSEN; GILROY, 2009) que ao ocorrer a expansão celular, exista a abertura de canais ósmo-sensores de cálcio sensíveis às variações do arranjo dos fosfolipídios da membrana. O aumento do Ca^{2+} interrompe a expansão de duas maneiras: primeiro, inibe a ação das ATPases e abrem canais de H^+ , conduzindo a alcalinização do apoplásto, que por sua vez, deve conduzir para a inibição da atividade das expansinas e outras enzimas envolvidas na expansão; em seguida, a ação do Ca^{2+} no citosol ativa enzima Phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns(3)P) que irá fosforilar proteínas componentes da NADPHoxidase, uma proteína produtora de EROs.

A ativação do ABP1 na membrana plasmática também codifica o acionamento de uma proteína G, denominada RAC/ROP GTPase. Segundo Berken e Wittinghofer (2008), as

proteínas G possuem papel chave na transdução de sinal nas células eucarióticas. RAC/ROPs são proteínas G específicas de plantas, elas podem se ligar facilmente às moléculas armazenadoras de energia semelhantes à ATP, as guanina trifosfato (GTP) e guanina difosfato (GDP). Assim, em meio celular as RAC/ROPs podem ser encontradas em três conformações diferentes, a saber: estado livre (sem nenhuma ligação); estado ativo, quando ligado a uma GTP e estado inativo quando ligada à GDP. RAC/ROP GTPases específicas denominadas ROP2 e RAP6 são ativadas pela ABP1. Sua função é modular a coordenação espacial das células vegetais na organização do citoesqueleto, articulando a estrutura e a disposição das estruturas que funcionam como “pilares de sustentação”, os filamentos de actina e microtúbulos.

Em nível de regulação gênica, as auxinas atuam na via de ubiquitinação dos TIR/AFB. No núcleo da célula vegetal, existem genes que são ativados somente na presença de auxinas por fatores de transcrição, denominados ARFs (Auxin response factors). Esses por sua vez, permanecem inativos, pois sobre condições normais estão ligados às proteínas repressoras da sua ativação, que no caso das auxinas são os AUX/IAA. Para degradar esses repressores e promover a ativação dos ARFs, existem complexos proteicos denominados SCF^{Tir/AFB} que participam de uma rota de degradação de proteínas conhecida como ubiquitinação. A molécula de auxina tem a capacidade de fazer a ligação entre o complexo SCF^{Tir/AFB} e o AUX/IAA, atuando como uma “cola molecular” promovendo a degradação da proteína repressora. Esta quando destruída, permite que os ARFs sejam ativados e os genes relacionados às respostas relacionadas à auxina, transcritos (BADESCU; NAPIER, 2006; TAN et al., 2007; SAUER, 2013).

2.2.1 Auxinas e sua atuação como herbicidas

Em 2007, Rahman e colegas observaram que o 2,4-D tem a capacidade de remover a actina e diminuir o fluxo citoplasmático. Recentemente, Rodríguez-Serrano et al. (2014) descobriu que a ação do 2,4-D sobre as estruturas do citoesqueleto de actina na célula leva a epinastia da planta e alteração na mobilidade de peroxissomos e mitocôndrias no ambiente celular. Como essas organelas movem-se ao longo do citoesqueleto, os autores propuseram que as alterações nos filamentos de actina afetam a dinâmica da atuação espacial dos peroxissomos e mitocôndrias no interior da célula. Essas organelas possuem fortes propriedades antioxidantes com função de metabolizar EROs da diferentes regiões do citoplasma. Assim, considerando o efeito dos herbicidas auxínicos na redução, agregação e

polimerização da actina, a capacidade de proteção antioxidativa das organelas começa a ter funcionalidade reduzida e a célula entra em forte estresse oxidativo, devido à limitação de movimento dos peroxissomos e mitocôndrias no seu interior.

A morte da maioria dos tecidos de plantas tratadas com herbicidas mimetizadores de auxinas é também causada pelo acúmulo de ácido abscísico (ABA) e etileno que também levam a condições de estresse oxidativo induzido pela alta produção de EROs (GROSSMAN, 2007, 2010). Estes radicais livres são produzidos por NADPH oxidases na membrana plasmática, que são ativadas também por RAC / ROP GTPases (JONES et al., 2007). A produção de EROs estão relacionadas às respostas de fechamento estomático, induzindo a inibição do crescimento celular, murcha de tecidos e morte celular.

Resumidamente, os herbicidas mimetizados de auxinas atuam inicialmente na membrana plasmática ativando ABP1 (RODRÍGUEZ-SERRANO et al., 2014), alterando citoesqueleto e consequentemente, reduzindo defesa antioxidante dos peroxissomos. Em um segundo processo (GROSSMAN, 2007, 2010) os herbicidas atuam na rota de ubiquitinação do TIR / AFB no núcleo da célula vegetal, onde genes da biossíntese de ABA e etileno são ativados, levando à superprodução de EROs que induz alterações no estado redox intracelular e extracelular. A atuação dessas Peroxidases e H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) causam reorganização da parede celular, em particular, na interligação da expansina (proteínas que existem em quantidades elevadas nas paredes das células), levando a desidratação de matriz e saturação da parede, tornando-a endurecida, o que leva a redução do crescimento celular (PEREIRA et al., 2011). Devido à perda da estrutura da parede celular, EROs são capazes de penetrar profundamente a membrana de plasma, onde podem interagir com fosfolípidos promovendo: 1) a insaturação de lipídeos da membrana plasmática, 2) o vazamento do citosol e 3) a morte celular.

2.3 A rota do chiquímato e a síntese dos aminoácidos aromáticos

Os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano são moléculas primordiais no funcionamento do metabolismo das plantas. Esses três aminoácidos atuam como blocos de construção de proteínas, sendo os principais precursores de uma variedade de hormônios vegetais, como auxinas e ácido salicílico. Os aminoácidos também participam na formação de grande parte de metabolitos aromáticos secundários que apresentam múltiplas funções biológicas atuando principalmente no metabolismo secundário e na defesa vegetal (VOGT, 2010).

A biossíntese de aminoácidos aromáticos tem sua formação iniciada na via do ácido chiquímico que ocorre no interior dos cloroplastos, também denominada via de biossíntese do corismato, que tem como seu princípio fundamental a conversão de dois metabólitos: o fosfoenolpiruvato (PEP), proveniente da via de lise da glicose e o eritrose 4-fosfato (E4-P), um composto intermediário na via da pentose fosfato, uma rota também muito relacionada com a glicólise. A conversão da PEP e E4-P, que resulta na formação do corismato é, composta por sete reações catalisadas por seis enzimas (TZIN; GALILI, 2010). Cada etapa será descrita conforme o trabalho realizado por (MAEDA; DUDAREVA, 2012).

A primeira enzima da via do chiquimato é a 3-desoxi-sintase d-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHPS) que converte PEP e E4-P em 3-desidróxidoquaianato (DAHP). A DAHPS são metaloenzimas que contem cátions metálicos bivalentes em sua estrutura (Mg^{2+} ou Co^{2+}), com capacidade de controlar o ambiente redox do plastídio associando dessa maneira o controle da via do chiquimato no fluxo de elétrons do fotossistema I (RUBIN; JENSEN, 1985; ENTUS; POLING; HERRMANN, 2002).

A enzima 3-desidroquinato sintase (DHQS) converte DAHP em 3-desidroquinato utilizando o cátion bivalente (Co^{2+}) e NAD^+ em cinco reações consecutivas: oxidação do álcool, β -eliminação de fosfato inorgânico, formação da carbonila, abertura do anel e formação de aldol (BENDER; MEHDI; KNOWLES, 1989).

A terceira reação que segue na via do ácido chiquímico corresponde à desidratação do 3-desidroquinato em 3-desidrochiquimato e em seguida a redução do 3-desidrochiquimato em chiquimato utilizando NADPH, que introduz a primeira dupla ligação no anel da molécula. As reações são realizadas pela enzima bifuncional 3-desidroquinato desidratase/ 3-desidroquinato desidrogenase (MOUSDALE; COGGINS, 1985).

A quinta enzima denominada chiquimato sintase, catalisa a fosforilação do grupo hidroxila do terceiro carbono do anel do ácido chiquímico, usando ATP como um co-substrato para produzir chiquimato-3-fosfato (S3P). A chiquimato sintase é modulada em diferentes estados de energia dependendo das concentrações relativas de ATP, ADP, AMP no interior do cloroplasto. Assim, a enzima regula a via do ácido chiquímico entre a energia necessária para realizar as reações da rota dos aromáticos e a energia disponível nas células vegetais (TOHGE et al., 2013, GAN et al., 2006).

A enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) catalisa a penúltima reação da via do ácido chiquímico formando 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato à partir da transferência da fração enolpiruvil da PEP para a hidroxila da posição 5 do ciclohexano na S3P (MAEDA; DUDAREVA, 2012).

A reação final da rota do chiquimato é realizada pela crismato sintase que elimina o fosfato e o oxigênio ligados na posição 3 do 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato, acrescentando no processo a segunda dupla ligação entre os carbonos no anel, formando o corismato. Apesar desta reação ser de caráter redox neutra, a crismato sintase necessita de ser reduzida por um mononucleotídeo do tipo riboflavina que doa um elétron para a enzima, de modo a facilitar a quebra do fósforo da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (MACLEAN; ALI, 2003). A fotoredução da riboflavina é mediada pela luz azul, mostrando a importância do ciclo circadiano na regulação da produção de aminoácidos aromáticos nos organismos vegetais (SCHALLER et al., 1991).

Em plantas, o corismato é o precursor comum de quatro rotas metabólicas diferentes que competem entre si para transformá-lo em triptofano, fenilalanina/tirosina, salicilato/filoquinona e folato.

O triptofano é o principal precursor das camalexinas, fitoalexinas e indol glucosinolatos compostos que conferem as plantas proteção contra herbivoria e infecções patogênicas (FERRARI et al., 2003; STOTZ et al., 2011; KISSEN; AHUJA, 2012; BONES, 2012). Além disso, o triptofano é precursor de moléculas que regulam o crescimento, como auxina e, por isso, os mutantes deficientes deste aminoácido apresentam fenótipo de crescimento reduzido e dominância apical (QUIEL; BENDER, 2003). Os mutantes também apresentam maior suscetibilidade a doenças fitopatogênicas (CONSONNI et al., 2010).

O aminoácido tirosina é precursor dos alcaloides isoquinolínicos, amido de hidroxycinamato e glicosídeos cianogênicos que são importantes para a defesa vegetal contra insetos fitófagos e fungos patogênicos (HARBORNE, 1990; JENSEN et al., 2011; BABST et al., 2014). A tirosina também é precursora das vias de síntese de pigmentos, como betalainas e quinonas, que são importantes nos processos de fotossíntese e na proteção a estresses oxidativos induzidos pela principalmente pela luz (DELGADO-VARGAS; JIMENEZ; PAREDES-LOPEZ, 2000). Além disso, o aminoácido aromático é precursor da suberina, cera presente nas plantas vasculares responsável por impermeabilizar as células vegetais conferindo defesa contra danos mecânicos e proteção à perda de água (FRANKE; SCHREIBER, 2007). O Mutante de *Arabidopsis* em alelos relacionados a síntese de tirosina apresentam inibição às respostas ligadas à luz, relacionadas com a menor atividade de sinalização dos fitocromos tipo A e B (SU; LAGARIAS, 2007).

A fenilalanina é precursora comum de vários compostos fenólicos relacionados a estresses ambientais, principalmente a fotoproteção e a atração de polinizadores. Os compostos aromáticos envolvidos nessas funções são: fenilacetaldéido, shikonin, flavonoides

e antocianinas (VERDONK et al., 2003; KNUDSEN; TOLLSTEN; BERGSTRÖM, 1993). A fenilalanina também está relacionada à proteção contra insetos e patógenos, pois induz a produção de ácido salicílico, taninos condensados e estilbenos, que são importantes para a defesa vegetal (LU, 2009; AYRES et al., 1997; VANNOZZI et al., 2012). A ubiquinona é outro composto produzido a partir da fenilalanina e tem importância fundamental na síntese de ATP nas mitocôndrias, atuando na cadeia transportadora de elétrons, estando presente em praticamente em todas as células dos organismos vegetais (POPOV et al., 2001). Os compostos de formação estrutural também são produzidos a partir da fenilalanina, as ligninas e lignanas são macromoléculas que formam as paredes das células vegetais, conferindo resistência e sustentação para os diferentes órgãos que compõem o organismo vegetal (WENG; CHAPPLE, 2010). O mutante de *Arabidopsis* deficiente na conversão de fenilalanina apresentou baixas taxas de germinação e desregulação no metabolismo de aminoácidos (VOLL et al., 2004).

2.3.1 Glifosato e a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase

Como já foi mencionado, a sexta enzima presente na via do chiquimato, a EPSPS, atua na junção do S3P com o enolpiruvil da PEP formando 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato e fósforo inorgânico. Essa reação é bioquimicamente incomum mas ocorre porque a enzima possui dois sites de ligação: O primeiro, que se liga à S3P e inicia uma reação de reversibilidade lenta, alterando a conformação dos sites ativos da EPSPS e inibindo sua ação por um curto período de tempo, formando dessa maneira uma fenda no interdomínio da EPSPS que impede a ligação do S3P e induz a ativação do segundo site de ligação, que faz a enzima se ligar com a PEP (BOOCOCK; COGGINS, 1983; STEINRUCKEN; AMRHEIN, 1984).

O Gli é um potente inibidor específico da EPSPS e atua quando a enzima já está associada ao S3P, se ligando no site em que o PEP se ligaria. Porém ao contrário do PEP o Gli tem capacidade de realizar duas ligações adicionais no site em que o S3P está ligado (SCHÖNBRUNN et al., 2001). Assim o herbicida forma um elo de ligação entre os dois sites de ligação da enzima, induzindo-a a permanecer no estado de transição entre a conformação aberta (sem S3P) e a fechada (associado com S3P e PEP), impedindo a enzima de retornar ao estado ativo. Dessa forma, quando grandes quantidades de herbicida chegam ao seu sítio de atuação, a maior parte das EPSPS são inativas, de maneira que a via de produção do

corismato se interrompe na formação do ácido chiquímico, induzindo o seu acúmulo no interior dos tecidos e células vegetais (SCHÖNBRUNN et al., 2001).

A redução nos níveis de aminoácidos aromáticos no metabolismo celular gera uma série de desordens metabólicas culminando em alterações na síntese de RNA e proteínas, destruição dos cloroplastos, redução da atividade fotossintética e clorose generalizada. Também há a alteração da atividade de mitocôndrias, aumentando-se a respiração celular. A permeabilidade da membrana plasmática, a síntese de ATP e o transporte de íons são alterados, induzindo a alterações no potencial osmótico e aumento no processo de senescência, culminando em abscisão e morte de tecidos (BRECKE; DUKE, 1980).

2.4 Micro-tom: organismo modelo para estudo da biologia vegetal

Uma das bases fundamentais para compreender os processos de transdução de sinal por moléculas químicas em organismos vegetais, é o uso de plantas modelos que permitem uma abordagem genética molecular para identificação de muitos componentes presentes nas respostas de sinalização química de caráter exógenos (ambiental e antrópico) e endógenos (fisiológicos e bioquímicos).

O tomateiro está entre os principais modelos genéticos vegetais, possuindo genoma relativamente pequeno (905 Mb), distribuído em 12 cromossomos e seu mapeamento cromossomal é bem estruturado, possuindo protocolos de transformação genica eficientes, além de ter um amplo banco germoplasma constituído por outras nove espécies do gênero *Solanum* seção *Lycopersicum*, com capacidade de cruzamento com tomateiros cultivados para fins comerciais (CARVALHO et al., 2011).

O Micro-Tom (MT) inicialmente foi criado para uso ornamental, mas nas últimas décadas vem sendo utilizado como modelo genético pois possui porte pequeno, permitindo sua produção em larga escala e devido também ao seu ciclo de vida curto (70-90 dias), produzindo de três a quatro gerações no ano. Além de possuir grande importância econômica o tomateiro, apresenta características de grande interesse como frutos carnosos, folhas compostas distribuídas em caule principal e associação radicular com micorriza (CAMPOS et al., 2010). As plantas também apresentam interações entre patógenos e pragas de importância econômica, o que torna o MT um modelo muito representativo às espécies encontradas na flora dos agroecossistemas.

O cultivar MT apresenta algumas mutações características que são responsáveis pelo seu fenótipo. O alelo mutante *dwarf* (*d*), uma mutação relacionada a biossíntese do hormônio

vegetal brassinoesteróide, confere ao MT seu porte pequeno e o alelo *self-pruning* é responsável pelo abito de crescimento indeterminado. Outras mutações presentes no MT são: *uniform ripening (u)*, que confere coloração verde uniforme em todo o fruto; *Stemphylium resistance* e *Immunity to Fusarium wilt* que conferem resistência a fungos patogênicos. A presença das mutações nos diferentes alelos não prejudica os resultados obtidos nas pesquisas científicas, pois as mutações hormonais que MT possui são atenuadas influenciando apenas no seu porte e no crescimento determinado, de modo que a germinação das sementes, crescimento e desenvolvimento da planta e seus órgãos exibem comportamento normal (CAMPOS et al., 2010).

O mutante *diageotropica (dgt)* apresenta menor sensibilidade às auxinas, suas folhas naturalmente apresentam epinastia severa. As respostas a gravitropismo das plantas de *dgt* são alteradas e o número de raízes laterais é reduzido (CARVALHO et al., 2011). A regulação do desenvolvimento vegetal governada pelas auxinas neste mutante é feita pela ciclofilina A (OH et al., 2006) que atuam como *cis-trans* isomerases no envelopamento de proteínas, fazendo-as assumir sua forma funcional. As ciclofilinas também atuam como chaperones moleculares, permitindo que proteínas mal formadas sejam re-envelopadas na conformação correta (KUMARI et al., 2013). A ciclofilina no entanto atua como um sinalizador intermediário participando de diversos processos do metabolismo da célula vegetal, dentre esses processos supõe-se que a mutação na ciclofilina A deva interferir na via de sinalização da ABP1 (CHRISTIAN et al., 2003). Em alguns estudos em que foram aplicados 2,4-D no *dgt*, foi constatada a insensibilidade ao herbicida em plântulas de tomateiro que não apresentaram epinastia (KELLY; BRADFORD, 1986). Em estudos recentes utilizando o marcador molecular GUS para o gene relacionado à expressão de auxinas DR5, o 2,4-D aumentou a expressão do gene nos meristemas radiculares do tomateiro selvagem, mas para o *dgt* a marcação do DR5 foi muito menor, demonstrando também a interferência da mutação na via sinalização SCF^{TIR/AFB} das auxinas (IVANCHENKO et al., 2015).

O *Never ripe (Nr)* é um mutante que apresenta insensibilidade ao hormônio etileno, portanto, as plantas não apresentam senescência, abscisão de folhas, flores, pétalas e outros órgãos que não sofrem abscisão, mesmo quando o fruto já se formou e desenvolveu. Os frutos após seu desenvolvimento, apresentam coloração amarelo-alaranjada, sendo esta a particularidade fenotípica mais característica do mutante (CARVALHO et al., 2011). A insensibilidade ao etileno ocorre pela mutação no receptor, impedindo-o de se ligar ao hormônio. Estudos em que plantas de *Nr* foram tratadas com 2,4-D, foi observado que a mutação alterava a epinastia induzida pelo herbicida. No entanto, os efeitos fitotóxicos eram

menores que em tomateiros normais (LANAHAN et al., 1994). Dessa forma, o mutante *Nr* foi utilizado nos estudos para a definição dos mecanismos dos herbicidas mimetizadores de auxina, uma vez que, além da insensibilidade ao etileno, o mutante também apresenta baixa produção de ácido abscísico (ABA) e de seu precursor, o xantoxal (HANSEN; GROSSMANN, 2000; GROSSMANN, 2010), mostrando-se assim, um excelente modelo para estudar os efeitos do 2,4-D e outros herbicidas dessa classe, na via de sinalização do SCF^{TIR/AFB}.

O mutante *yellow-green2* possui alterações nas respostas fotomorfogênicas, de maneira que apresenta no início de seu desenvolvimento hipocótilos alongados, folhas verde-amareladas, porte mais alto e menor quantidade de ramificações que o MT (CARVALHO et al., 2011). A mutação do *yg2* está em uma heme oxigenase, precursora da síntese do cromóforo que é necessário para a gênese de todos os tipos de fitocromos, uma vez que o cromóforo faz parte dos vários domínios que compõem esses pigmentos protéicos que são responsáveis controle do desenvolvimento vegetal pela luz, principalmente nos comprimentos de onda do vermelho e vermelho distante (DAVIS et al., 2001). Dessa forma, devido a pluralidade de alterações dadas por mutações no cromóforo, é suposto que tanto os fitocromos de Tipo I (fitocromo A que apresenta respostas fotossensíveis – percepção da luz vermelho distante) e Tipo II (Fitocromos B1, B2, E e F que se apresentam na forma fotoestáveis – percepção da luz no vermelho ou branca) são alterados (CARVALHO et al., 2011; VAN TUINEN et al., 1996). A importância das respostas induzidas pela luz no vermelho e vermelho distante nos mecanismos de ação do Gli foram reportados recentemente (SHARKHUU et al., 2014) em um mutante de *Arabidopsis*, tolerante ao herbicida que apresentava deficiência na atuação do fitocromo B, coordenador da expressão de genes que codificam enzimas da rota do ácido chiquímico, nas diferentes horas do dia. As respostas da atuação do Gli pelo mutante de tomateiro *yg2* ainda não foram reportadas pela literatura, no entanto, pela variedade de fitocromos que a mutação no cromóforo deste mutante interfere, é possível que exista como em *Arabidopsis*, tolerância a ação do herbicida.

3 OBJETIVOS

- Analisar a interação química entre os componentes das diferentes formulações de 2,4-D e Gli por RMN, de maneira a identificar possíveis modificações no deslocamento químico dos átomos que compõem os herbicidas.

- Identificar possíveis metais e sua concentração nas diferentes formulações comerciais de Gli e 2,4-D para analisar se sua interferência atua sobre os herbicidas estudados.

- Utilizar herbicidas radiomarcados para caracterizar a absorção das diferentes formulações de 2,4-D e Gli, aplicados separadamente e em mistura em plantas de tomateiro - MT.

- Encontrar alguma dose em que o antagonismo entre o 2,4-D e Gli esteja evidente, de maneira a facilitar o estudo e o entendimento da interação dos herbicidas na espécie modelo MT.

- Utilizar mutantes de tomateiro com alterações na sinalização de rotas relacionadas às auxinas (*dgt*, e *Nr*) e mutantes pouco responsivos à luz e que são mais tolerantes à ação do Gli (*yg2*) para descrever os mecanismos que induzem o antagonismo entre os herbicidas.

- Estudar o comportamento de absorção e translocação dos herbicidas no interior de plantas de MT e mutantes de tomateiro.

- Compreender a atuação de antagonismo do Gli em relação ao 2,4-D por meio de análise histoquímicas de expressão do gene repórter GUS marcado no gene DR5 na via de sinalização gênica das auxinas.

- Analisar o estado redox do interior da célula por meio de ensaios de localização in-situ de H_2O_2 e $\text{O}_2^\bullet$ em plântulas de MT e demais mutantes.

- Avaliar o acúmulo de ácido chiquímico de maneira a comparar a interferência do 2,4-D no mecanismo de ação do Gli em plantas de MT e seus mutantes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Ecotoxicologia (CENA/USP) em Piracicaba/SP, no Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal (ESALQ/USP) em Piracicaba/SP e no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (Embrapa Instrumentação) em São Carlos/SP.

4.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para estudo da conformação molecular do Gli, 2,4-D e suas misturas em diferentes formulações

Experimentos analíticos foram conduzidos segundo a metodologia utilizada por Thelen et al. (1995), de modo a determinar a interação química entre os herbicidas 2,4-D e Gli em solução. Foram estudadas as formulações comerciais de 2,4-D Sal Colina e Dimetilamina. As formulações de Gli foram Isopropilamina, Dimetilamina, Potássico (todas na forma líquida de concentrado solúvel) e Amoníaco (granulado dispersível). Para analisar o efeito isolado das interações químicas entre os herbicidas ácidos e as bases que compõem a formulação, foram produzidas, em laboratório, as formulações comerciais utilizando produtos técnicos. Os produtos utilizados foram: 2,4-D ácido, Gli ácido, dimetilamina, isopropilamina, hidróxido de potássio, hidróxido de amônio (solução aquosa 40%), hidróxido de colina (solução aquosa 20%), todos 99% de pureza (Sigma-Aldrich). A concentração de 2,4-D foi de 5,2 mM, o que foi equivalente à 280 g ia ha⁻¹ e para o Gli 6,8 mM, também 280 g ia ha⁻¹, ambos os valores reportados por Flint e Barrett (1989) como sendo as doses de maior antagonismo da mistura dos herbicidas, sendo que mais tarde Thelen et al. (1995) utilizaram-se desses valores para estudos de RMN. Em todos os tratamentos, óxido de deutério (D₂O) foi o solvente utilizado. Para avaliar a interação do 2,4-D e Gli ácidos, o solvente utilizado foi D₂O e metanol à 5%.

Todas as análises foram feitas por um espectrômetro da marca Bruker 600 MHz. Os espectros de ¹H e ³¹P foram obtidos em sonda de 5 mm. Para ¹H, o pico do solvente foi referenciado à 4.65 ppm (D₂O) e quanto aos espectros de ³¹P para análise do Gli, utilizou-se um capilar com ácido fosfórico, que no espectro foi referenciado à 0 ppm. Todas as amostras foram analisadas à temperatura de 32,8°C. O pH das diferentes formulações e misturas foi quantificado. Os experimentos foram repetidos de maneira a obter resultados sempre semelhantes.

A presença de íons metálicos nas diferentes formulações comerciais de Gli e 2,4-D foi quantificada utilizando-se espectrometria de chama para sódio e espectrometria de absorção atômica para cálcio, ferro, zinco, magnésio e manganês.

4.2 Cultivo das plantas de tomateiro e aplicação de herbicidas

Em todos os experimentos em que utilizou-se plantas de tomateiro, o cultivo foi realizado germinando-se inicialmente a semente em vasos de 250 mL contendo substrato PlantMax e vermiculita expandida (1:1), adubados com NPK (10:10:10) e 4 g de calcário dolomítico por litro de substrato (conforme os protocolos em: <http://www.esalq.usp.br/docentes/lazaropp/protocols.html>). Após duas semanas da semeadura, as plantas foram transplantadas para vasos de 150 mL com o mesmo substrato e, depois de 15 dias, cada vaso foi adubado com 0,5 g de NPK (10:10:10). Os vasos foram mantidos em casa de vegetação em condições de temperatura controladas (25°C) e eram irrigados duas vezes ao dia para manter as plantas livres de estresse hídrico.

As plantas foram pulverizadas aproximadamente 15 dias após o transplântio, no estágio de 6 a 7 folhas verdadeiras. As flores foram retiradas com bisturi logo no começo de sua formação para analisar o comportamento dos herbicidas somente nas partes vegetativas. Os tratamentos de cada experimento foram aplicados utilizando uma câmara de aspersão com ponta Teeget XR 110.02, volume 243 L ha⁻¹ de calda, conforme os ensaios de antagonismo realizados por Flint e Barret (1989).

4.3 Uso de herbicidas radiomarcados para estudos de absorção e translocação

Em todos os estudos em que foram caracterizados os comportamentos de absorção de translocação de herbicidas, foram utilizadas moléculas de 2,4-D e Gli ácido marcadas com ¹⁴C com pureza rádio-química de 99% e atividade específica de 8.632,1 MBq (143.868.333 dpm mg⁻¹) para o Gli e 2.510,82 MBq (41.847.000 dpm mg⁻¹) para o 2,4-D.

Figura 1 - Folíolos do ápice foliar Região aplicada com solução rádio-marcada

Em todos os experimentos, as plantas de tomateiro foram aplicadas em câmara de pulverização, sendo os três últimos folíolos da quarta folha verdadeira protegidos com papel alumínio. Após a aplicação na câmara, o papel alumínio foi retirado e uma solução equivalente ao tratamento pulverizado contendo herbicida radiomarcado foi aplicada com microseringa em dez pontos diferentes de cada folíolo que foi coberto. Em todos os experimentos a radiação aplicada foi 666,66 Bq ou 40.000 dpm. O herbicida radiomarcado era sempre acrescentado à calda preparada com formulação comercial e, para não alterar a estequiometria dos componentes do produto comercial (as mesmas reportadas nos experimentos de RMN), era acrescentada a base correspondente à formulação comercial formulada.

Em todos os experimentos foram feitas três repetições. Após o período de coleta determinado para cada experimento, as plantas foram retiradas dos vasos e as folhas tratadas foram lavadas com metanol 80% para retirar a radioatividade não absorvidas. Em seguida, todo o material foi prensado com jornal e seco em estufa de circulação forçada por 72 horas, sendo que uma planta foi separada para que se fizesse a autorradiografia representativa para cada tratamento específico em cada experimento. Na sequência, as plantas foram fracionadas (folha tratada, demais folhas, caule e raiz) para quantificar a radioatividade de cada parte. Posteriormente, foi feita a incineração de cada parte em condições controladas, para quantificar o herbicida absorvido. Assim, o $^{14}\text{CO}_2$ produzido em cada tecido foi quantificado por um aparelho contador de cintilação e a quantidade de herbicida absorvida foi calculada pela equação:

$$\% \text{ Habs} = \frac{(^{14}\text{C Tec.Oxi.})}{(^{14}\text{C Teci.Oxi.} + ^{14}\text{C Lav.})} \times 100$$

Onde: “Habs” é a quantidade de herbicida absorvido pela planta; “ ^{14}C Teci.Oxi.” é a quantidade de ^{14}C quantificado no tecido oxidado e “C lav.” é a quantidade de ^{14}C detectado na lavagem da folha tratada.

Para os estudos de translocação, considerou-se apenas a radiação absorvida e a folha aplicada foi utilizada como referência para estudar a quantidade de herbicida que se movimentou dentro da planta, portanto a equação utilizada foi:

$$\% \text{ Hnãotrasl} = \frac{(^{14}\text{C F.Ap.})}{(^{14}\text{C F.Ap.} + ^{14}\text{C Dem. Teci.})} \times 100$$

Onde: “Hnãotrasl” é a quantidade de herbicida não translocado pela planta; “ ^{14}C F.Ap.” é a quantidade de ^{14}C quantificado na folha aplicada (descartando-se o que foi lavado) e “ ^{14}C Dem. Teci.” é a quantidade de ^{14}C detectado em todos os outros tecidos fora da folha tratada.

4.4 Absorção de diferentes formulações de 2,4-D e Gli em plantas de tomateiro

Foram utilizadas diferentes formulações comerciais dos herbicidas Gli e 2,4-D para analisar sua absorção em plantas de Micro-Tom. Foram realizados dois experimentos semelhantes: no primeiro experimento, utilizou-se ^{14}C -Gli e no segundo, ^{14}C -2,4-D. O delineamento experimental foi fatorial dois por quatro inteiramente casualizado, em que os tratamentos eram as duas formulações de 2,4-D e quatro de Gli, a concentração de 2,4-D foi de 5,2 mM, o que foi equivalente à 280 g ia ha⁻¹ e para o Gli 6,8 mM, também 280 g ia ha⁻¹ (FLINT; BARRETT, 1989). Como há diferença entre o peso molecular entre as formulações de cada herbicida, as formulações foram preparadas de modo que a quantidade de Gli ou 2,4-D ativo fosse a mesma para todos os tratamentos (herbicida ativo). As plantas foram colhidas 72 horas após o tratamento (HAT), tempo em que a absorção dos herbicidas já está saturada (PALLAS, 1960; HETHERINGTON et al., 1999).

4.5 Estudos de eficácia de interação entre 2,4-D e Gli em plantas de tomateiro

Diferentes doses de Gli e 2,4-D foram testadas isoladamente e em mistura. A montagem do experimento foi baseada no trabalho de interações de herbicidas realizados por (FLINT et al., 1988). O delineamento do primeiro experimento foi um fatorial inteiramente casualizado cinco por cinco com três repetições. Os tratamentos para ambos herbicidas foram em gramas de herbicida ativo: a) testemunha sem aplicação; b) 35; c) 70; d) 140 e e) 280. Para evitar variação entre as formulações dos herbicidas utilizou-se 2,4-D e Gli dimetilamina. A coleta do experimento foi feita 21 dias após o tratamento dos tratamentos, data em que se era possível ver claramente as diferenças entre os tratamentos. As plantas foram retiradas dos vasos e, após a lavagem das raízes, foram colocadas em estufa para secar por 72 horas à 75°C. Em seguida, foi feita a pesagem de massa seca de toda a planta.

4.6 Caracterização do efeito das misturas de 2,4-D e Gli em mutantes de tomateiro

Para se estudar a existência de antagonismos de ordem bioquímica e fisiológica na via de sinalização dos diferentes herbicidas, nas plantas de MT e os mutantes *dgt*, *Nr* e *yg2*, foram aplicadas com as doses que apresentaram maior antagonismo no ensaio de eficácia realizado anteriormente, sendo as doses eleitas para 2,4-D (35 g – 0,65 mM) e Gli (70 g – 1,7 mM), ambas na formulação dimetilamina. As plantas foram submetidas à avaliação visual de controle semanalmente até 21 dias, onde “0” representa ausência total de sintomas e “100” representa morte da planta. No final da última avaliação, as plantas foram colhidas e secas em estufa à 75°C e sua massa seca (caule e raiz) foi pesada. O delineamento experimental foi fatorial inteiramente casualizado, comparando-se os mutantes e os herbicidas aplicados isoladamente, em mistura e testemunha sem aplicação. Utilizou-se três repetições.

4.7 Aspectos da translocação dos herbicidas 2,4-D e Gli em mutantes de tomateiro

Para determinar o movimento dos herbicidas entre os tecidos vegetais das plantas de tomateiro MT e mutantes, as doses descritas no item 4.6 foram marcadas com 2,4-D e Gli radiomarcado (^{14}C -Gli e ^{14}C -2,4-D). Realizou-se dois experimentos, um para cada herbicida radiomarcado, seguindo os seguintes tratamentos: para o primeiro experimento, A) ^{14}C -Gli e B) ^{14}C -Gli + 2,4-D e para o segundo, A) ^{14}C -2,4-D e B) ^{14}C -2,4-D + Gli, aplicados da maneira descrita pelo item 4.3. Após 21 dias da aplicação dos tratamentos, as plantas foram colhidas e

lavadas conforme descrito no item citado anteriormente (4,3). Após a secagem das plantas em estufa, essas foram separadas e submetidas à biooxidação para quantificar a radiação de cada parte e calcular a quantidade de herbicida retido na folha aplicada.

4.8 Ensaios histoquímicos em plântulas

Os ensaios a seguir foram conduzidos utilizando plântulas de tomate controle, mutantes e transgênicos. Cultivadas em gerbox, as sementes foram inicialmente esterilizadas com hipoclorito 5% por 5 minutos e colocadas em câmara escura à 27°C. Após a germinação, os gerbox foram transferidos para sala de crescimento com iluminação e aí permaneceram por mais 10 dias até a abertura completa dos cotilédones e formação dos primeiros folíolos.

Os tratamentos e doses de 2,4-D e Gli seguiram conforme o item 4,6. A aplicação dos herbicidas foi feita emergindo a parte aérea (meristema apical, cotilédones e caulículo) de seis plântulas nas soluções de cada tratamento herbicida de modo, que a raiz não entrou em contato com o herbicida. Após a aplicação, as plântulas foram devolvidas para o gerbox e, depois de três dias do tratamento, foram retiradas do meio de crescimento e submetidas a tratamentos específicos de cada experimento. Os métodos apresentados a seguir são de análise qualitativa.

4.8.1 Expressão do gene DR5 responsivo à auxina pelo marcador β -glucuronidase (GUS)

Para avaliar possíveis interferências do Gli nas vias de transdução de sinal da ativação do gene responsivo às auxinas (DR5) ativadas pelo 2,4-D, esse método se baseia na clivagem do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo (X-gluc) pela β -glucuronidase na presença de oxigênio, que leva a formação de dímeros, resultando em precipitados de cor azulada no local onde o gene foi expresso (JEFFERSON et al., 1986). Para tanto, utilizou-se transgênicos de MT DR5:GUS e, após receberem os tratamentos de herbicidas, foram mergulhados em solução tampão (100 mM NaH_2PO_4 ; 10 mM de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 0,05% Trion X-100 e 1mM de X-Gluc) para que as reações ocorressem. O material vegetal foi mantido na solução por 24 horas, no escuro, à 37°C. Após esse período, as plântulas foram lavadas e conservadas em etanol 70% para retirar os pigmentos de clorofila e facilitar a observação das áreas onde o gene foi expresso. A observação e captação de imagens dos tecidos foi feita por um microscópio estereoscópico eletrônico.

4.8.2 Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) *in situ*

Para avaliar o estresse oxidativo ocorrente no ambiente da célula causado pela produção de EROs induzido principalmente pelo herbicida 2,4-D nos tecidos, foram realizados dois experimentos distintos.

O primeiro experimento foi conduzido para avaliar a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por meio do marcador 3,3'-Diaminobenzidino (DAB) que é capaz de formar precipitados de coloração amarronzada ao reagir com H_2O_2 (FREDERICK, 1897). A solução de DAB foi preparada na concentração de 1 mg mL^{-1} em água ultrapura em pH 3,0 ajustado com HCl. Em seguida, a solução foi incubada a 50°C , 1 hora, sob agitação. Terminada a incubação, a solução foi filtrada e o pH foi ajustado para 5,6 com KOH. Após a solução ter atingido a temperatura ambiente, as plântulas foram emersas e a solução foi colocada no vácuo por 10 minutos e, depois, encubada por 2 horas no escuro. Em seguida, as plantas foram iluminadas até o aparecimento dos pontos amarronzados da precipitação do DAB e, após a lavagem, foram colocadas em etanol fervescente para retirada dos pigmentos naturais.

O segundo experimento foi conduzido para avaliar a produção de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) por meio do marcador Nitrozul de tetrazólio (NBT) que produz um precipitado de coloração azulada quando reage com $O_2^{\bullet-}$. A solução de 0,1% de NBT foi preparada em água ultrapura contendo 50 mM de K-fosfato (pH 6,4) e 10 mM de Na-azide. As plântulas colocadas na solução foram submetidas a vácuo por 10 minutos e, em seguida, foram iluminadas até o aparecimento dos pontos de deposição do marcador, sendo depois lavadas e colocadas em etanol fervescente para retirada dos pigmentos.

A observação e captação de imagens dos tecidos para ambos os experimentos foram feitas por um microscópio estereoscópico eletrônico.

4.9 Quantificação do acúmulo de ácido chiquímico por cromatografia líquida (HPLC-DAD)

Para analisar a atuação do Gli no metabolismo celular, foram realizados ensaios de determinação do acúmulo de Ácido Chiquímico nos mutantes tratados conforme o item 4.6. Utilizou-se um cromatógrafo líquido (Agilent, série 1200) equipado com quaternária, injetor automático, degaseificador e detectores de arranjo de diodos (DAD). A coluna (Kromasil C18, 250 x 4.6 mm : 100 – 5 μm) foi mantida à temperatura de 30°C e o volume de injeção

foi de 20 μL . A composição do solvente da fase móvel foi água ajustada à pH 3 com ácido fosfórico e metanol (95 : 5%). O fluxo foi de 1 mL min^{-1} e o comprimento de onda do detector DAD foi fixado para 212 nm.

A curva de calibração do equipamento e validação do método analítico foi feita utilizando-se ácido chiquímico padrão analítico (99% Sigma-Aldrich). Na elaboração da curva de calibração, foram diluídos na fase móvel diferentes concentrações de ácido chiquímico (2,5; 5; 10; 50; 100; 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os coeficientes de correlação obtidos foram de 98,98%. O tempo de retenção encontrado para o ácido chiquímico foi de 3,158 minutos (Figura 2).

Figura 2 - Cromatografia da solução fortificada com ácido chiquímico (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Detecção por DAD ($\lambda = 212$ nm), aluição em água pH 3 com ácido fosfórico e metanol (95 : 5%), fluxo de 1 mL min^{-1} , volume de injeção de 20 μL . O gráfico ao lado representa a correlação de calibração para recuperação analítica entre soluções fortificadas com concentrações conhecidas e respectivas áreas encontradas por cromatografia

Para os testes de recuperação foram fortificado 200 mg de tecido (folhas liofilizadas e trituradas de MT) com diferentes concentrações de ácido chiquímico (0, 625, 1250 e 3750 $\mu\text{g g}^{-1}$). Após a secagem do solvente, o material foi submetido ao processo de extração que será descrito logo mais. O coeficiente de correlação da recuperação de ácido chiquímico nos tecidos foi de 99,98 – 109,9% (possivelmente pela presença do ácido chiquímico endógeno naturalmente produzido).

Para a extração do ácido chiquímico, as folhas de cada mutante e tratamento foram coletadas e congeladas rapidamente em nitrogênio líquido a cada sete dias após da aplicação dos herbicidas até 21 dias. O material congelado foi liofilizado, triturado e, em seguida, foram pesados 0,2 gramas em tubos de teflon, sendo que para a extração utilizou-se ácido clorídrico (0,25 N). O material foi agitado durante 10 minutos e colocado no ultrassom por 20 minutos. Logo após, os tubos foram centrifugados a 11.000 rpm, o sobrenadante foi separado, avolumado em 10 ml com fase móvel e injetado no cromatógrafo.

4.10 Análises estatísticas, gráficas e qualitativas

Os resultados de porcentagem para os ensaios fatoriais de radiação absorvida (Item 4.3), de massa seca (Item 4.4 e 4.5), de controle (itens 4.5) e de radiação não translocada (Item 4.7) foram submetidos aos testes de normalidade de resíduos (Shapiro), homogeneidade de variância (Bartlett) e análise da variância (ANOVA), com subsequente aplicação do teste de Tukey para comparações múltiplas, com diferença mínima de significância calculada a 5%.

Para os ensaios de acúmulo de ácido chiquímico, as respostas encontradas em cada mutante foram apresentadas em diferentes gráficos elaborados com base em ANOVAs e em análises de regressão para ajuste do modelo matemático que melhor explicam o comportamento de acúmulo do ácido chiquímico ao longo dos dias de avaliação. A comparação entre os diferentes tratamentos herbicidas em cada data de avaliação foi feita através do teste de Tukey, a 5% de significância.

As análises histoquímicas qualitativas foram apresentadas selecionando-se apenas uma imagem que representasse o resultado obtido para cada tratamento de cada experimento realizado. Nos ensaios de DR5::GUS e EROs quanto mais intensa a coloração do tecido, maior é produção da variável analisada. No caso do ensaio de DR5::GUS, a coloração do tecido é azulada. Para H_2O_2 , os precipitados de DAB são de cor amarronzada e no $O_2^{\bullet-}$, o NBT são azul-arrocheada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RMN para estudo da conformação molecular do Gli, 2,4-D e suas misturas em diferentes formulações

Antes de estudar as misturas entre os herbicidas, cada molécula que compunha as formulações foi analisada. A figura 3 apresenta os espectros de H-NMR dos padrões analíticos componentes das formulações. O espectro do Gli ácido foi muito semelhante aos encontrados pelos trabalhos de Thelen et al. (1995): os hidrogênios do grupo metileno ligados e do ácido carboxílico aparecem na forma de um singlete desdobrado assimétrico na posição 3,9 ppm, o grupo metileno e grupo fosfórico no Gli estão presentes como dubleto simétrico à 3,22 ppm e a integração das assinaturas encontradas foi na proporção de 2:2. No caso do espectro de ^{31}P do Gli, obteve-se um tripleto representando o grupo fosfato do Gli, sendo que o desdobramento do sinal em três, ocorre pela presença dos prótons das duas hidroxilas ligadas ao fósforo do Gli (Figura 4 B).

O espectro do 2,4-D ácido apresentou três assinaturas entre 3 e 5 ppm, região típica de compostos aromáticos em proporção de 1:1:1. O dubleto a 6,92 ppm apresentou acoplamento com o duplo dubleto da região de 7,25 ppm, dessa forma, pode-se caracterizá-lo como os hidrogênios ligados aos carbonos vizinhos das posições 5 e 6 do benzeno. O singlete desdobrado a 7,48 ppm está acoplado com o duplo dubleto a 7,25 ppm, mas não acopla com o da posição 6,92 ppm, dessa forma, pode-se caracterizá-lo como o hidrogênio ligado ao carbono de posição 3 no anel benzeno. O radical metila ligado a carboxila ressonaram na região de 4,71 (Figura 3 B).

A isopropilamina apresentou duas assinaturas de ressonância: uma na forma de multiplete na região de 3,02 ppm, representando o radical CH ligado ao grupo amina e um dubleto à 1,02 ppm, representando os dois radicais metila, na proporção de 1:6 (Figura 3 C). No caso da dimetilamina, o espectro é formado apenas por um singlete a 2,58 ppm, representado pelas duas metilas ligadas à amina (Figura 3 D). O espectro de ressonância do hidróxido de colina apresentou, para as três metilas ligadas à amina: um singlete na região 3,15 ppm com área integrada 9, um multiplete em 3,45 ppm com área 2 para o radical metileno também ligado a amina e um multiplete de área 2 a 4,01 ppm para o radical metileno ligado à hidroxila do final da cadeia (Figura 3E).

Figura 3 - Espetros de ¹H-RMN de A) Glifosato; B) 2,4-D; C) Isopropilamina; D) Dimetilamina; E) Colina. Os valores assinalados em vermelho são os resultados relativos da integração dos picos obtidos. Os números em azul se referem à posição do espectro que os picos dos diferentes hidrogênios se encontram. Os valores em ppm colocados acima de cada pico são correspondentes a posição dos átomos marcados na estrutura química desenhada na parte superior de cada espectro. Nos espectros A, B, C e E, as assinaturas foram ampliadas para melhor visualização. O solvente utilizado foi óxido de deutério para A, C, D e E. Para o espectro B o solvente foi óxido de deutério e metanol deuterado a 5%

Tabela 1 - Deslocamento químico obtido dos padrões analíticos de 2,4-D e Glifosato, ambos na forma ácida. O solvente utilizado foi óxido de deutério e metanol deuterado* (5%)

Herbicidas:	$^1\text{H-RMN}$ <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <chem>ClC1=CC(=C(C=C1)OC(=O)O)C=C1</chem> </div> <div style="text-align: center;"> <chem>OC(=O)CNCP(=O)(O)O</chem> </div> </div>						$^{31}\text{P-RMN}$
	H ₃	H ₅	H ₆	CH ₂	CO ₂ -CH ₂	PO ₃ H ₂ -CH ₂	
	ppm						ppm
Glifosato					3,90	3,14	8,58
2,4-D	6,93	7,22	7,45	7,42			
Glifosato + 2,4-D	6,93	7,22	7,45	7,43	3,90	3,14	8,58

* Sinal em 3,22 ppm

Fonte: São Carlos, 2014

Figura 4 - Deslocamento químico dos herbicidas 2,4-D, Gli e sua mistura. A) $^1\text{H-RMN}$ de Gli (preto); 2,4-D (verde); 2,4-D + Gli (vermelho). B) $^{31}\text{P-RMN}$ de Gli (preto); 2,4-D + Gli (vermelho). O solvente utilizado foi óxido de deutério e metanol deuterado (5%)

Avaliando a interferência entre os dois herbicidas misturados em sua forma ácida, não foram observadas mudanças consideráveis nos deslocamentos químicos dos diferentes hidrogênios que compõem as cadeias do Gli (3,9 e 3,14 ppm) e 2,4-D (6,93; 7,22; 7,45 e 7,42 / 7,43 ppm) (Tabela 1 Figura 4 A). O mesmo foi observado para os espectros de fósforo do Gli, onde independentemente de estar em mistura com o 2,4-D, o deslocamento foi de 8,58 ppm (Tabela 1 Figura 4 B).

Tabela 2 - Dados de ^1H -RMN do deslocamento químico de diferentes formulações de glifosato e 2,4-D aplicados separadamente e em mistura. O solvente Óxido de Deutério foi utilizado para todas as formulações. São Carlos, 2014.

Tratamentos	pH	H3	H5	H6	CH ₂	CO ₂ -CH ₂	PO ₃ H ₂ -CH ₂	NH ₃ ⁺ -CH	CH ₃ -CH-CH ₃	N-C ₂ H ₆	N-C ₄ H ₉	N-CH ₂	CH ₂ -O
ppm													
Formulados a partir de padrões analíticos													
a - Glifosato Acid	4,22					3,93	3,22						
b - Glifosato Isopropilamina	5,45					3,71	3,18	3,45	1,25				
c - Glifosato Dimetilamina	4,48					3,69	3,18			2,68			
d - Glifosato Potássico	5,39					3,69	3,16						
e - Glifosato Amoníaco	5,17					3,69	3,15						
f - 2,4-D Dimetilamina	9,37	7,48	7,25	6,85	4,51					2,68			
g - Glifosato Isopropilamina + 2,4-D Dimetilamina	5,94	7,48	7,25	6,85	4,52	3,69	3,18	3,45	1,25	2,68			
h - Glifosato Dimetilamina + 2,4-D Dimetilamina	5,49	7,48	7,25	6,85	4,52	3,69	3,17			2,68			
i - Glifosato Potássico + 2,4-D Dimetilamina	4,95	7,48	7,26	6,85	4,51	3,69	3,16			2,68			
J - Glifosato Amoníaco + 2,4-D Dimetilamina	5,71	7,48	7,26	6,85	4,51	3,68	3,15			2,68			
k - 2,4-D Colina	9,31	7,48	7,25	6,85	4,51						3,15	3,46	4,01
l - Glifosato Isopropilamina + 2,4-D Colina	5,47	7,48	7,26	6,85	4,52	3,69	3,17	3,45	1,25		3,15	3,46	4,01
m - Glifosato Dimetilamina + 2,4-D Colina	4,75	7,48	7,25	6,85	4,52	3,69	3,18			2,68	3,15	3,46	4,01
n - Glifosato Potássico + 2,4-D Colina	5,42	7,48	7,26	6,84	4,51	3,69	3,16				3,15	3,46	4,01
o - Glifosato Amoníaco + 2,4-D Colina	5,25	7,48	7,26	6,85	4,51	3,68	3,15				3,15	3,46	4,01
Formulados a partir de produtos comerciais													
B - Glifosato Isopropilamina	4,85					3,68	3,16	3,45	1,26				
C - Glifosato Dimetilamina	4,85					3,68	3,15			2,68			
D - Glifosato Potássico	4,76					3,68	3,16						
E - Glifosato Amoníaco	3,85					3,7	3,2						
F - 2,4-D Dimetilamina	5,37	7,48	7,26	6,85	4,51					2,68			
G - Glifosato Isopropilamina + 2,4-D Dimetilamina	4,89	7,44	7,24	6,85	4,5	3,68	3,16	3,45	1,25	2,67			
H - Glifosato Dimetilamina + 2,4-D Dimetilamina	4,76	7,47	7,25	6,85	4,51	3,68	3,15			2,67			
I - Glifosato Potássico + 2,4-D Dimetilamina	4,84	7,45	7,24	6,85	4,51	3,69	3,16			2,68			
J - Glifosato Amoníaco + 2,4-D Dimetilamina	4,09	7,46	7,24	6,85	4,52	3,69	3,19			2,68			
K - 2,4-D Colina	5,00	7,48	7,25	6,85	4,51						3,15	3,46	4,01
L - Glifosato Isopropilamina + 2,4-D Colina	4,87	7,45	7,24	6,85	4,5	3,68	3,15	3,45	1,25		3,14	3,46	4
M - Glifosato Dimetilamina + 2,4-D Colina	4,83	7,46	7,25	6,85	4,51	3,68	3,15			2,67	3,14	3,46	4,01
N - Glifosato Potássico + 2,4-D Colina	4,82	7,45	7,24	6,85	4,5	3,68	3,16				3,14	3,46	4,01
O - Glifosato Amoníaco + 2,4-D Colina	4,24	7,46	7,25	6,85	4,52	3,69	3,17				3,14	3,46	4,01

Figura 5 - Espectros de ^1H -RMN de glifosato e 2,4-D em diferentes formulações. Cada espectro é acompanhado por uma letra que se refere a Tabela 2, onde o valor das posições de cada pico está descrito. Óxido de Deutério foi o solvente utilizado para todos os tratamentos

Analisando o efeito das diferentes formulações de Gli, 2,4-D e suas misturas (Tabela 2 e Figura 5) formuladas com padrões analíticos, não foi possível analisar grandes alterações no deslocamento químico entre os espectros encontrados. A única alteração de maior relevância encontrada, apesar de muito sutil, foi na região do grupo fosfórico entre as formulações do Gli sais de amina (dimetilamina e isopropilamina, ambas 3,18 ppm – Tabela 2, b; c) e as formuladas com as outras bases solúveis (hidróxidos de potássio – 3,16 ppm e amônio – 3,15 ppm). A diferença entre os deslocamentos químicos entre as formulações foram de apenas 0,02 e 0,03 (Tabela 2 b – o). No entanto, aparentemente o efeito dessas diferenças está apenas pela variação da formulação, não sofrendo nenhuma alteração pela presença do 2,4-D. Esse deslocamento químico foi verificado com maior intensidade nos espectros de ^{31}P , em que para formulações à base de amina ressonaram em regiões mais acima do campo (9,05 – 9,11 ppm Tabela 3, b – g) em relação as outras formulações (8,89 – 8,99 ppm Tabela 3, h – m).

As formulações comerciais também não apresentaram grandes mudanças nos tratamentos estudados, com exceção das formulações de Gli sal de amônio, que apontou diferença de deslocamento químico na região do grupo fosfato a 3,2 ppm (Tabela 2, E), ou seja, de 0,04 – 0,05 ppm em relação às outras formulações de Gli sem 2,4-D. Interessante ressaltar que ao ser misturada com 2,4-D dimetilamina, as diferenças de deslocamento químico do Gli sal de amônio praticamente não se alteraram (Tabela 2, J – 3,19 ppm), porém para formulações de 2,4-D colina, o deslocamento foi praticamente igual ao de outras formulações, passando de regiões entre 3,19 e 3,2 ppm (Tabela 2, E; J) para 3,17 ppm (Tabela 2, O).

Analisando os espectros de ^{31}P das formulações comerciais, podem-se observar deslocamentos menores que os padrões analíticos. Ao comparar as formulações de Gli sem mistura e em mistura com 2,4-D, a formulação dimetilamina apresentou menor deslocamento químico (8,95 ppm – Tabela 3, E), enquanto que as formulações isopropilamina (8,99 ppm – Tabela 3, B) e potássio (8,98 ppm Tabela 3, H) não apresentaram grandes mudanças entre si. A formulação comercial de Gli sal de amônio demonstraram grandes alterações na região do fosfato com assinatura mais eletronicamente desblindada (9,12 ppm – Tabela 3, K) com deslocamento de mais de 0,1 ppm em relação as outras **formulações**.

A variação do pH entre as diferentes formulações obtidas pelos padrões analíticos aparentemente não foi o fator de alteração no deslocamento químico dos herbicidas, uma vez que, mesmo tendo a diferença de uma unidade de pH entre algumas formulações não associadas e outras em mistura (Tabela 2, “b” e “c”; “d” e “e”; “i” e “j”), não houve alterações significativas entre os espectros.

Figura 6 - Espectros de ^{31}P -RMN de glifosato formulado separadamente e associado com 2,4-D, ambos em diferentes formulações. Cada espectro é acompanhado por uma letra que se refere a Tabela 3 onde o valor das posições de cada pico está descrito. Óxido de Deutério foi o solvente utilizado para todos os tratamentos.

Tabela 3 - Dados de ^{31}P -RMN do deslocamento químico de diferentes formulações de glifosato preparadas sem mistura e misturadas com diferentes formulações de 2,4-D - O solvente Óxido de Deutério foi utilizado para todas as formulações.

Formulações de Glifosato					
	Ácido	Isopropilamina	Dimetilamina	Potássico	Amoníaco
	ppm				
Formulados a partir de padrões analíticos (1)					
Sem 2,4-D	A / a - 8,81	b - 9,11	e - 9,10	h - 8,99	k - 8,93
2,4-D Dimetilamina		c - 9,09	f - 9,05	i - 8,94	l - 8,91
2,4-D Colina		d - 9,08	g - 9,05	j - 8,94	m - 8,89
Formulados a partir de produtos comerciais (2)					
Sem 2,4-D		B - 8,99	E - 8,95	H - 8,98	K - 9,12
2,4-D Dimetilamina		C - 8,97	F - 8,92	I - 8,95	L - 9,10
2,4-D Colina		D - 8,94	G - 8,91	J - 8,94	M - 9,07

O pH entre as formulações comerciais de Gli potássico, isopropilamina e dimetilamina não variaram muito entre si, mesmo quando misturados com 2,4-D (4,76 a 4,89 Tabela 2 B – D; G – I e L – N), o pH das formulações de 2,4-D foi um pouco mais alto em relação aos outros tratamentos realizados (5,37 para dimetilamina e 5 para colina Tabela 2 – F e K). No entanto, o Gli sal de amônio e suas misturas com 2,4-D apresentaram pHs mais baixos (3,85 para o tratamento E; 4,09 no tratamento J e para o tratamento O 4,24). Dessa forma, o pH do meio poderia estar relacionado com a alteração do deslocamento químico do hidrogênio, principalmente na região do fosfato no Gli, contudo, conforme observado nos formulados padrões (Tabela 2 e 3 letras minúsculas) essa interferência não é por parte do contra-íon (Isopropilamina, dimetilamina, K^+ , NH_4^+ e Colina) que acompanha a formulação, pois nos padrões formulados apesar terem apresentado diferença de pH não apresentaram alterações significativas nos espectros como já descrito.

A quantificação dos íons metálicos presentes nas diferentes formulações comerciais apontou grandes teores de sódio em todas as formulações estudadas (Tabela 4). Para as formulações Gli sal de amônio, as quantidades encontradas foram as mais altas, chegando à 29.000 mg de Na por Kg de produto comercial.

Tabela 4 - Concentração de metais elementares nas diferentes formulações de 2,4-D e glifosato

Herbicidas	Formulações	Na	Fe	Ca	Zn	Mg	Mn
		mg L ⁻¹					
2,4-D	Dimetilamina	3.200,00	22,64	28,00	ND	69,00	0,93
	Colina	5.000,00	12,6Fe8	4,70	ND	ND	0,21
Glifosato	Isopropilamina	2.300,00	1,87	0,90	ND	ND	0,60
	Dimetilamina	2.700,00	2,30	1,10	1,14	ND	0,75
	Potássico	3.400,00	4,40	ND	0,64	ND	0,90
	mg Kg ⁻¹						
	Amoníaco	29.000,00	13,84	1,10	0,83	ND	1,15

ND = Não detectado

Fonte: Piracicaba, 2015.

O teor dos íons de Fe, Ca, Zn, Mg e Mn não foram significativos. No entanto, para o sódio, as formulações de Gli e 2,4-D apresentaram quantidades expressivas do metal. Para a dose e volume de calda utilizados no trabalho (Ver Item 4.1), o Gli isopropilamina apresentou 11,5 mg L⁻¹ (0,5 mMol) de Na, a formulação dimetilamina, 6,08 mg/L⁻¹ (0,26 mMol), potássio, 7,41 mg/L⁻¹ (0,32 mMol) e para amônio, 37,84 mg/L⁻¹ (1,645 mMol). Para o 2,4-D, os níveis de Na para a formulação dimetilamina foram 5,51 mg/L⁻¹ (0,24 mMol) e para colina foi 15,39 mg/L⁻¹ (0,67 mMol).

Os resultados de RMN descritos acima divergem dos encontrados por Thelen (1995), em que o autor analisando misturas de Gli ácido e 2,4-D dimetilamina comercial observou grande deslocamento químico do espectro do Gli, concluindo que os cátions de dimetilamina associavam com o Gli afetando sua conformação. O Gli na sua forma ácida, facilmente realiza trocas catiônicas com outros elementos com carga presentes na solução, assim, pelo fato de não estar formulado, provavelmente a associação com a dimetilamina foi facilitada. Dessa forma, para os resultados apresentados acima, os padrões analíticos formulados que formaram os sais das diferentes formulações de 2,4-D e Gli, demonstram que não existem grandes alterações na orientação estrutural que poderiam ser causadas pela atuação dos cátions dimetilamina, isopropilamina, potássio, amônio ou colina. Pequenas alterações na região do fosfato do Gli foram encontradas entre os padrões analíticos formulações. Isso provavelmente ocorre pela diversidade de cargas que o Gli possui em sua estrutura, por isso é proposto que ocorra atração iônica do tipo covalente coordenada entre a região com carga positiva (N^+) do contra-íon amina que compõe cada uma das formulações que se interajam com os oxigênios do grupo fosfato do Gli. Esse tipo de ligação é comum entre aminas e oxigênio, em que ocorre o compartilhamento de elétrons da amina para o oxigênio, de forma que este último elemento permaneça mais eletronegativo, permitindo então sua atração com nitrogênio positivo da amina. O outro tipo de ligação que existe entre o Gli e os contra-íons das diferentes formulações de 2,4-D e Gli, está no agrupamento amina de carga positiva (N^+) no centro da molécula do Gli, que se liga a um hidrogênio da amina por meio de ligações de hidrogênio, em que a atração entre polos formados pelos átomos de hidrogênio são atraídos pela carga positiva da amina. Dessa forma, as duas interações existentes entre amina e Gli formam um complexo ligante de forma hexagonal (Figura 7 A).

A força de uma base não depende somente da natureza dos componentes das moléculas que às compõem, antes a disposição espacial de suas estruturas exerce efeito fundamental sobre sua reatividade (efeito estérico). Assim, os compostos como isopropilamina e dimetilamina provavelmente têm maior capacidade de formar esses tipos de complexos, isso provavelmente se deve pela maior quantidade de radicais metila, que impedem a molécula de se desprender do Gli com facilidade. As formulações contendo hidróxido de amônio apresentou esse efeito mais atenuado, ocorrendo provavelmente pela estrutura simples do amônio que possui apenas hidrogênios como ligantes e, assim, associa-se e dissocia-se facilmente com o Gli, o que provavelmente dificulta a formação desses complexos. Com relação ao K^+ , provavelmente o ligante não se forma. No entanto, por ser um

elemento extremamente eletropositivo, é capaz de atuar nos oxigênios da região do grupo fosfato do Gli.

Em todas as formulações de Gli, as misturas com 2,4-D apresentaram deslocamentos sutis para regiões mais baixas do campo, demonstrando, dessa forma, a atuação das formulações de 2,4-D na nuvem eletrônica da região do grupo fosfato, deixando-a menos blindada, ou seja, mais livre da interferência dos cátions presentes na solução. Algo interessante é que formulações de 2,4-D à base de Colina induzem ainda mais essa condição. Ocorrendo, possivelmente, pelo aumento da concentração de íons na solução de aplicação, o que induziu maiores interações de repulsão e atração dos compostos de diferentes cargas dentro da solução. Assim, para colina que possui três radicais metil em sua estrutura, deve-se ao mesmo interferir menos intensamente nos ânions presentes no sistema e, ainda, pelo seu maior tamanho e complexidade, interferir na dinâmica de outros cátions presentes na mistura. O mesmo deve acontecer com a dimetilamina, contudo, em menor intensidade, devido à menor quantidade de radicais metil existentes na sua estrutura (Figura 7 B).

Em estudos de espectrometria de emissão plasmática, Thelen et al. (1995), analisaram os componentes metálicos presentes nas formulações comerciais de 2,4-D dimetilamina e butoxi-etil-éster. Os autores encontraram níveis de Ca e Na discretamente mais altos que outros metais, mas em quantidades pouco significantes em relação a solução final de aplicação, dessa forma, os autores concluíram que a presença de outros componentes orgânicos provavelmente alterariam a atuação do Gli ácido, principalmente quando aplicados com as formulações de 2,4-D butoxi-etil-éster. O efeito de 4,11 mMol de Na em formulação de Gli Isopropilamina misturado ou não com 2,4-D, proporcionou redução de 20% controle em trigo (*Triticum aestivum* L.) (NALEWAJA; MATYSIAK, 1992). Levando em conta esses resultados e os encontrados pelas quantificações de Na realizados neste trabalho, as alterações observadas no deslocamento do Gli sal de amônio não são decorrentes da interferência do amônio, mas provavelmente pelo Na (1,645 mMol) que apresentou altos teores para essa formulação, em combinação com outros possíveis compostos que não aparecem ou são de difícil classificação nos espectros de RMN estudados. Provavelmente, o efeito de interação desses compostos com o Gli aumenta em pH mais baixo.

Figura 7 - A) Simulação das conformações previstas entre a associação glifosato e cátions de suas diferentes formulações (I - isopropilamina, II - dimetilamina ou III - de amônio) com base em resultados de RMN-¹H e ³¹P. É proposto a existência da atração iônica entre o N⁺ do cátion e um oxigênio do grupo fosfato do glifosato. Além disso, provavelmente há uma outra atração iônica entre N⁺ presente no glifosato e um hidrogênio do cátion, essas atrações iônicas podem levar a formação de um ligante anel hexagonal. As formulações que contem K⁺ como cátion, o ligante não se forma. No entanto por, ser um elemento extremamente eletropositivo, é capaz de atrair o grupo P do glifosato, sendo também atraído pelos oxigênios da região. B) Simulações tridimensionais dos mapas de densidade eletrônica e conformação prevista das formulações de 2,4-D dimetilamida e colina para análise de possível efeito estérico, explicando as pequenas diferenças de deslocamento químico encontradas quando eram misturadas com glifosato (formulados com padrões analíticos). Os grupos metil e metileno em torno da sua região com carga N⁺ podem interferir na dinâmica de atração e repulsão entre os outros compostos com cargas presentes na mistura, uma vez que quanto maior a quantidade de grupos químicos entorno da carga N⁺, menor sua exposição. Por possuir grupos químicos menores (dois grupos metila), as formulações dimetilamina provavelmente apresentam maior “exposição” de sua carga, gerando maior interferência nas cargas do glifosato em relação à colina (três grupos metila). Os átomos de hidrogênio (branco), carbono (cinza), o nitrogênio (azul), e oxigênio (vermelho) são representados pelas esferas

Dessa maneira, é possível assumir que o sistema formado pelas formulações de 2,4-D e Gli é complexo e dependem dos fatores que compõem as diferentes formulações comerciais. Esses, por sua vez, podem tanto condicionar a situações de maior deslocamento químico, que é o caso das formulações de Gli sal de amônio, quanto atuar levando os deslocamentos para regiões mais baixas do espectro, como no caso da adição de formulações de 2,4-D. Essas diversidades de mudanças estão relacionadas às interações dos componentes iônicos que formam a solução comercial e podem estar aliadas ou não às mudanças do ambiente químico que as misturas de herbicida induzem.

5.2 Dinâmica da absorção das diferentes formulações de 2,4-D e Gli

O resultado das análises estatísticas do efeito das diferentes formulações de 2,4-D sobre a absorção de Gli radiomarcado foi obtido por análise de variância. As pressuposições do modelo obtidas pelo teste da normalidade de Shapiro-Wilk e homogeneidade Bartlett a 5% de significância, apontaram normalidade dos resíduos (valor-p = 0,6082) e homogeneidade das variâncias (valor-p = 0,196).

De acordo com os resultados da análise de variância (Anexo – Tabela S1), verificou-se diferenças significativas para os fatores principais das diferentes formulações de Gli (Anexo – Tabela S1 Fator 1 Valor-p: < 0,01) e para os fatores principais das aplicações de herbicida sem mistura e misturado com diferentes formulações de 2,4-D (Anexo – Tabela S1 Fator 2 Valor-p: 0,04). Entre os demais fatores não foram encontrados diferenças significativas (Anexo – Tabela S1 F1 x F2 Valor-p: 0,28).

Assim, analisando o teste de comparação das médias de absorção do Gli (Figura 8), não houve diferença estatística para as formulações isopropilamina, dimetilamina e potássio, todos apresentando absorção entre 82,66 e 91,14% do total de radiação aplicada. A formulação de Gli sal de amônio apresentou 69,29% de absorção do herbicida, ou seja, redução de mais de 15% em relação às outras formulações.

Quando se misturou 2,4-D com o Gli, foi observada diferença significativa apenas para a formulação isopropilamina, em que com a mistura dos dois herbicidas, houve acréscimo de quase 10% (de 82,66 para 90.89%) da absorção de toda a radiação aplicada.

Figura 8 - Os gráficos de barra com intervalos de confiança representam a quantidade de radiação absorvida (0 a 100%) de Gli radiomarcado sozinho e em mistura com 2,4-D, em diferentes formulações comerciais. A média de cada tratamento é colocada logo acima da barra correspondente em conjunto com os resultados do teste de Tukey, em que letras maiúsculas referem-se à comparação entre colunas (vertical) e minúsculas entre linhas (horizontal). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade. Autorradiografias representativas revelam a absorção e o movimento de ¹⁴C-Gli e as marcações escuras indicam regiões de mais elevada concentração de ¹⁴C-Gli no tecido. Cada autorradiografia é representativa do perfil obtido em todas as repetições de cada tratamento. Dados obtidos em plantas de Micro-Tom 72 horas após o tratamento. Fonte: Piracicaba, 2014

No caso do experimento realizado com 2,4-D radiomarcado, as pressuposições do modelo obtidas foram significativas tanto para normalidade dos resíduos (Valor-p = 0,22), quanto para homogeneidade de variância (Valor-p = 0,29). Os resultados da análise de variância foram semelhantes aos do ¹⁴C-Gli, apresentando diferença estatística apenas para os fatores principais (Anexo – Tabela S2, Fator 1 Valor-p < 0,01; Fator 2 < 0,01 e F1 x F2 = 0,68). Todas as análises foram feitas considerando um nível de 5% de significância.

A comparação das médias de absorção do 2,4-D apresentou maior absorção na formulação colina (79,41%) em relação à formulação dimetilamina (68,71%). Esta última, não exibiu mesma absorção quando era aplicada em mistura com Gli sal de amônio, contudo, quando misturada com as demais formulações de Gli, a absorção foi incrementada em cerca de 20%, ou seja, para mais de 80% de absorção do herbicida aplicado (Figura 9). Apesar de se observar aumento nas médias de absorção do 2,4-D colina quando misturado com as formulações isopropilamina, dimetilamina e potássio (mais de 90%), não houve diferença

estatística quando a formulação de 2,4-D foi aplicada sem mistura (79,41%) e em conjunto com a formulação de Gli sal de amônio (76,32%) (Figura 9).

Figura 9 - Os gráficos de barra com intervalos de confiança representam a quantidade de radiação absorvida (0 a 100%) de ¹⁴C-2,4-D sozinho e em mistura com Gli, em diferentes formulações comerciais. A média de cada tratamento é colocada logo acima da barra correspondente em conjunto com resultados do teste de Tukey, em que letras maiúsculas referem-se à comparação entre colunas (vertical) e minúsculas entre linhas (horizontal). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade. Autorradiografias representativas revelam a absorção e o movimento de ¹⁴C-2,4-D e as marcações escuras indicam regiões de mais elevada concentração de ¹⁴C-2,4-D no tecido. Cada autorradiografia é representativa do perfil obtido em todas as repetições de cada tratamento. Dados obtidos em plantas de Micro-Tom 72 horas após o tratamento. Fonte: Piracicaba, 2014

Pelos perfis de translocação das diferentes formulações de 2,4-D e Gli mostrados nas autorradiografias, pode-se perceber que a maior parte do herbicida radiomarcado permaneceu na região da folha aplicada para todos os tratamentos, principalmente para tratamentos em que o Gli sal de amônio estava presente. Em algumas autorradiografias é possível observar fortes traços de radiação somente nas posições em que as gotas do herbicida foram depositadas (Figura 9, 2,4-D dimetilamina + Gli sal de amônio), comprovando a menor absorção encontrada pelos tratamentos com a formulação. Para as formulações de ¹⁴C-Gli (Figura 8), nos tratamentos em que se utilizou o herbicida sem mistura, aparentemente a translocação foi maior que quando misturada com 2,4-D, sendo maiores os traços de radiação em outros tecidos diferentes da folha tratada. No caso do 2,4-D, os tratamentos de maior absorção (mistura com Gli isopropilamina, dimetilamina e potássico), em suas autorradiografias, apresentaram traços mais fortes de radiação em outros tecidos não aplicados, no entanto, o perfil geral de translocação do herbicida não se alterou entre os tratamentos.

Em 1989, Flint analisando o perfil de absorção do ¹⁴C-Gli em *Sorghum halepense*, a mistura com 2,4-D nas mesmas doses utilizadas acima, encontrou diferenças na absorção entre a aplicação de Gli isopropilamina sem mistura (23%) e misturado com 2,4-D isopropilamina (19%). Essa alteração do comportamento do herbicida pode ser explicada

pelas diferenças morfológicas da cutícula das gramíneas e das plantas de folha larga. Na superfície foliar existem dois tipos de cera: o de formato cristalino, que é dominante em espécies de gramíneas e o de formato amorfo, presente na maior parte das espécies de folhas largas. O formato cristalino é um obstáculo para a absorção de agroquímicos, uma vez impede o contato direto entre a gota de aplicação e a superfície foliar (WANG, 2007).

Em um trabalho de Lym (2000), constatou-se maior absorção de 2,4-D quando aplicado em conjunto com Gli (de 40% para 87,2%), no entanto, a absorção do Gli foi menor quando misturado com 2,4-D (de 62% para 27%). Porém, autor ao preparar a formulação radiomarcada não obedeceu a estequiometria da formulação de 2,4-D e isopropilamina, e segundo a metodologia colocou excesso de amina, o que provavelmente alterou os padrões de absorção para ambos os herbicidas. As doses utilizadas no trabalho foram 450 g ia ha⁻¹ para Gli e 700 g ia ha⁻¹ para 2,4-D, sendo ambas as formulações isopropilamina.

A absorção de herbicidas hidrofílicos é dada pelos poros polares do interior da membrana plasmática, Schönherr (2002) estudando a absorção das formulações de Gli amoníaco, isopropilamina, trimetil sulfônio, potássico e sódico não encontrou diferença significativa. No entanto, as formulações que continham cátions monovalentes absorveram o herbicida mais rápido que as formulações que cotiam cátions orgânicos e amônio. Neste mesmo trabalho, foi avaliado a absorção do herbicida em diferentes doses, pHs e aplicação em ambientes com umidade relativa diferentes. A umidade foi o parâmetro mais importante, uma vez que, o Gli apresentou maior velocidade de absorção em ambientes com maior umidade relativa. O pH não alterou a taxa de absorção e a concentração de herbicida em relação à sua absorção, seuindo padrões lineares de incremento, de modo que, o dobro da concentração aplicada, seguiu velocidade de absorção também duas vezes maior.

Schönherr (2006) descreve que o movimento de soluções aquosas nos poros hidrofílicos é por difusão, ou seja, o caminhamento das moléculas de áreas mais concentradas (gota de aplicação) para áreas de mais baixa concentração (apoplásto foliar), assim nesse processo, os cátions e ânions penetram em quantidades equivalentes no interior do poro. Dessa forma, para manter a absorção do herbicida, também é necessário que esse gradiente seja mantido durante toda a rota no interior do poro, inclusive na interface do meio exterior para o interior da célula. Se houver algum impedimento de ordem física ou química para a entrada de íons no interior do poro, do apoplásto ou da célula, o poro pode saturar-se e, conseqüentemente, o gradiente entra em equilíbrio e a absorção é cessada (Figura 10).

Mediante os resultados obtidos da absorção e caracterização química das diferentes formulações de 2,4-D e Gli, algumas hipóteses podem ser propostas para explicar os efeitos encontrados. O incremento da absorção das formulações de Gli e 2,4-D, quando aplicados em conjunto, provavelmente foi maior em função do aumento da concentração da gota aplicada como descritos por (SCHÖNHERR, 2002). Dessa forma, mesmo não apresentando diferenças no seu comportamento químico na solução de aplicação, o Gli e 2,4-D foram melhores absorvidos para alguns tratamentos, conforme acima descrito.

Figura 10 - Representação esquemática da absorção dos herbicidas no interior dos poros polares até o simplásto. Para a ocorrência da absorção, é necessário a manutenção de um gradiente químico na interface do simplásto e apoplásto, de modo que o herbicida “caminhe” sempre seguindo esse gradiente partindo da região da cutícula, onde a gota foi depositada e a concentração é maior, para as regiões menos concentradas do interior dos tecidos vegetais. A quebra da interface do simplásto e apoplásto, ou desidratação no interior do poro quebra o gradiente, de modo que o herbicida não seja mais absorvido. Fonte: Piracicaba, 2015

Com a presença de cátions como Na^+ , Ca^{2+} , Fe^{3+} e outros íons com cargas, ocorre a competição pelas moléculas de água livre no interior dos poros polares, proporcionando a formação de camadas de hidratação, de forma que os ânions presentes na solução permaneçam pouco ou praticamente desidratados, promovendo a saturação do poro e sua

parcial desidratação (SCHÖNHERR, 2006). No caso do Gli sal de amônio, as grandes quantidades de íons sódio encontradas em sua formulação provavelmente induzem esse tipo de desidratação prematura no interior das vias de absorção do herbicida.

O 2,4-D colina apresentou maior absorção em relação ao dimetilamina, isso se deve provavelmente pelas diferenças que existem entre as duas formulações na sua capacidade de permanecer no estado aquoso. Essa propriedade é dada pela constante de Henry que avalia, a partir da pressão de vapor de determinada substância, a quantidade de gás que permanece dissolvida no meio aquoso, de forma que quanto menor o valor obtido pela constante, maior será a capacidade de se reter gases no interior da solução, sendo assim, a constante de Henry para o 2,4-D dimetilamina é de $8,6 \cdot 10^{-6} \text{ Atm.m}^3.\text{mol}^{-1}$ e do colina é de $1,4 \cdot 10^{-16} \text{ atm.m}^3.\text{mol}^{-1}$, ou seja, uma razão de $6,14 \cdot 10^{10}$ vezes. Dessa maneira, a evaporação para a atmosfera com presença do 2,4-D dimetilamina é bem maior do que com colina, permitindo que as gotas de aplicação contendo herbicida permaneçam na superfície da folha por mais tempo, o que consequentemente aumenta a absorção. Outros compostos orgânicos existentes nas formulações podem também exercer influência sobre a absorção, esses ao serem sorvidos nas ceras da cutícula, diminuem sua viscosidade e aumentam a mobilidade do herbicida remanescente na cutícula.

5.3 Interação entre a mistura de 2,4-D e Gli em plantas de Micro-Tom

Para aplicar o teste da análise da variância, as pressuposições do modelo foram cumpridas, sendo que apontaram normalidade dos resíduos (valor-p = 0,51) e homogeneidade das variâncias (valor-p = 0,08).

De acordo com os resultados da análise de variância (Anexo – Tabela S3), verificou-se diferenças significativas para todas as doses e suas combinações (Valor-p < 0,01 para todos os fatores), sendo feito o desdobramento de cada um dos fatores (Anexo – Tabelas S4 e S5). O único fator que não apresentou diferença estatística foi a dose de 280 g ia ha^{-1} de 2,4-D (Anexo – Tabela S4, p-valor: 0,09).

Figura 11 - A combinação de subdoses de glifosato e 2,4-D em plantas de Micro-Tom resulta em antagonismo diminuindo a eficiência de controle. A figura demonstra o aspecto do resultado de aplicação de diferentes doses (0, 35, 70, 140 e 280 g, e,a, ha⁻¹) de 2,4-D e Glifosato em plantas de MT após 21 dias após os tratamentos, cultivados em casa de vegetação (10 a 12 folhas verdadeiras)

Tabela 5 - Efeito da combinação de várias doses de Glifosato e 2,4-D na massa seca de plantas de MT (raízes e parte aérea) 21 DAT^a. Fonte: Piracicaba, 2014.

Micro-Tom - Massa seca					
Glifosato (g i.a. ha ⁻¹)	2,4-D (g i.a. ha ⁻¹)				
	0	35	70	140	280
	Média das massas (g)				
0	3,44 a A ^b	2,34 b B	1,94 bc AB	1,94 bc B	1,49 c AB
35	2,73 a B	1,98 bc BC	2,46 ab A	2,75 a A	1,71 c A
70	1,66 b C	3,09 a A	1,91 b AB	1,84 b B	0,92 c BC
140	1,74 ab C	1,58 b C	2,35 a A	1,30 bc BC	0,77 c BC
280	1,27 a C	1,37 a C	1,42 a B	1,06 a C	0,85 a C

CV = 22.09 % ^aDAT - Dias após os tratamentos ^bLetras maiúsculas referem-se à comparação entre colunas e minúsculas entre linhas. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A obtenção da dosagem em que o efeito antagônico entre os herbicidas era mais explícito foi feita escolhendo resultados que apresentassem menores valores de massa seca nos tratamentos aplicados separadamente em relação aos herbicidas misturados. Assim, a combinação de herbicidas que apresentaram média de massa seca maior quando em mistura foram as doses de 70 g i.a. ha⁻¹ (1,7 mM) para o Gli e de 35 g i.a. ha⁻¹ (0,65 mM) para o 2,4-D

(Figura 11, Tabela 5), uma vez que a massa obtida foi 3,09 g na combinação dos herbicidas em relação a 1,66 g para o Gli e 2,34 g para o 2,4-D, quando aplicados separadamente.

5.4 Caracterização da eficácia dos herbicidas e suas misturas em mutantes de tomateiro

Mutações nas vias de sinalização das auxinas e nas respostas fotomorfogênicas induziram diferentes respostas ante aos efeitos de 2,4-D e Gli e suas combinações, permitindo, dessa maneira, entender parte dos diversos mecanismos que podem estar relacionados ao antagonismo induzido pelos herbicidas em mistura.

Os resultados da análise da variância foram obtidos para controle visual (Shapiro: p-valor = 0,44 e Bartlett = 0,067) e para quantificação de massa seca (Shapiro: p-valor = 0,63 e Bartlett = 0,06). Em ambas as análises, foram encontradas diferenças significativas entre os mutantes e cada tratamento com herbicida, tanto para análise da variância quanto nos desdobramentos dos fatores, onde o p-valor encontrado foi sempre menor que 0,05. (Anexo – Tabelas S6, S7, S8, S9, S10, S11).

Nos resultados do teste de Tukey (Figura 12), o efeito dos herbicidas no MT quando aplicados separadamente, apresentaram menor massa seca (Gli = 2,69 g; 2,4-D = 2,51 g) em relação à aplicação da mistura (3,93 g), mostrando claramente o efeito de antagonismo dos herbicidas. Com relação ao controle visual a tratamento com Gli (48,33%), não se diferenciou da mistura (55,83%), no entanto, o 2,4-D teve um controle bem maior quando aplicado sozinho (75%).

O *dgt* apresentou epinastia pouco acentuada e menor sensibilidade ao 2,4-D (4,89 g e 8,33%; Figura 12), o antagonismo foi aparentemente maior que o MT, uma vez que o tratamento da mistura dos herbicidas apresentou maior massa seca e menor controle (*dgt* = 3,95 g e 51,43%) em relação ao tratamento com Gli (*dgt* = 2,5 g e 35%).

Figura 12 - Diferentes mutações na via de sinalização das auxinas e nas respostas fotoromorfológicas por fitocromo, alteram as respostas de antagonismo entre os herbicidas 2,4-D e glifosato. No quadro acima, são apresentados os fenótipos do cultivar Micro-Tom e os mutantes, *diageotropica* (*dgt*), *Never ripe* (*Nr*) e *yellow-green2* (*yg2*), aplicados com as doses de 2,4-D (35 g e.a. ha⁻¹ – 0,65 mM), glifosato (70 g e.a. ha⁻¹ – 1,7 mM) e testemunha sem aplicação, após 21 dias da aplicação dos herbicidas separadamente e em mistura. Os gráficos de barra com intervalos de confiança representam a média da porcentagem de controle visual (barras pretas intervalo 0 – 100%) e massa seca (barras em cinza – unidade em gramas). A média de cada tratamento é colocada logo acima da barra correspondente em conjunto com resultados do teste de Tukey, em que letras maiúsculas referem-se à comparação entre colunas (vertical) e minúsculas entre linhas (horizontal). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade

O mutante *Nr*, apresentou menor efeito do 2,4-D como o *dgt* (Figura 12). No entanto, no controle visual, os resultados foram muito semelhantes ao MT de forma que a mutação para insensibilidade ao etileno aparentemente não apresentou muita diferença para Gli (50,63%) com e sem 2,4-D (52,89%). Com relação à massa seca os padrões também foram semelhantes ao MT, a mistura (4,5 g) apresentou valores maiores em relação ao Gli (3,08 g) sem ser misturado, contudo, o aumento da massa nos tratamentos em que foi aplicado 2,4-D, pode ser em parte pela lignificação que o herbicida induz nos tecidos, tornando-os mais densos.

No caso do mutante *yg2*, as massas secas menores foram para o 2,4-D (4,65 g), enquanto as massas do tratamento com Gli (5,61 g) não apresentou diferença estatística com a mistura (5,18 g). No caso do controle visual, os tratamentos com Gli apresentaram baixos

sintomas de clorose e necrose em relação aos outros mutantes e ao MT. O tratamento com 2,4-D e com mistura dos herbicidas apresentaram controles semelhantes, de forma que aparentemente ao atenuar-se o efeito do Gli, se restaura os danos causados pelo 2,4-D na mistura dos dois herbicidas.

Analisando os resultados de cada tratamento entre todas as plantas de tomateiro estudadas (Figura 12), o acúmulo de massa seca para o *yg2* (8,25 g) foi maior em relação ao MT e os outros mutantes na testemunha sem aplicação. No caso dos tratamentos aplicados com Gli, o mutante *yg2* foi o que teve menor efeito (36,66% e 5,61 g). Nos tratamentos com 2,4-D os mutantes que apresentaram menor controle foram *dgt* (8,33% e 4,89 g) e *Nr* (30% e 5,48 g). Para o mutante *yg2*, a massa seca obtida (4,65 g) foi igual àqueles mutantes, porém a porcentagem de controle (60%) ficou semelhante ao MT (75%). Para a mistura dos herbicidas, o MT (55,83%) e *Nr* (52,89%) apresentaram controles semelhantes, o *dgt* (35%) foi o que demonstrou menor porcentagem de controle e o *yg2* (67,5%), a maior. Na mistura dos herbicidas não houve diferença entre as massas obtidas entre o MT e os mutantes.

5.5 Translocação dos herbicidas 2,4-D e Gli em mutantes de tomateiro

A absorção do Gli no MT e nos mutantes de tomateiro demonstraram diferentes valores segundo o teste da análise de variância (Anexo – tabela S12), em que todos os fatores estudados apresentaram valores menores de 5% (Shapiro: p-valor = 0,22 e Bartlett = 0,78). No desdobramento dos fatores, foram observadas diferenças entre a translocação da mistura dos dois herbicidas (Anexo – Tabela S13, valor-p < 0,01), enquanto que para as diferentes plantas de tomateiro, a translocação dos herbicidas no MT e *yg2* apresentaram diferença significativa, ambos com valor-p < 0,01 (Anexo – Tabela S14).

No caso da translocação do Gli, houve diferença na quantidade de radiação que ficou retida na folha aplicada apenas na interação dos fatores (Mutantes x ^{14}C -Gli, p-valor = 0,03, Anexo – Tabela S15). No desdobramento entre o herbicida aplicado sem mistura e misturado com 2,4-D, houve diferença estatística apenas para o Gli sem mistura (Anexo – Tabela S16, p-valor = 0,02). Com relação às plantas de tomateiro, o MT (p-valor = 0,03) e *yg2* (p-valor = 0,04) também apresentaram diferença estatística (Anexo – Tabela S17).

Figura 13 - A presença do 2,4-D diminui a translocação do Gli. No quadro acima, são apresentadas autorradiografias representativas revelando a absorção e o movimento de ¹⁴C-Gli em MT e os mutantes, *diageotropica* (*dgt*), *Never ripe* (*Nr*) e *yellow-green2* (*yg2*), aplicados com as doses de 2,4-D (35 g e,a, ha⁻¹ – 0,65 mM) e glifosato (70 g e,a, ha⁻¹ – 1,7 mM), após 21 dias da aplicação dos herbicidas. As marcações escuras indicam regiões de mais elevada concentração de ¹⁴C-Gli no tecido. Cada autorradiografia é representativa do perfil obtido em todas as repetições de cada tratamento. Os gráficos de barra com intervalos de confiança representam a quantidade média de radiação absorvida (barras pretas 0 – 100%) e radiação retida no tecido aplicado (barras em cinza – 0 – 100%). As médias de cada tratamento são colocadas logo acima da barra correspondente em conjunto com resultados do teste de Tukey, em que letras maiúsculas referem-se à comparação entre colunas (vertical) e minúsculas entre linhas (horizontal). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade. Fonte: Piracicaba, 2014

O resultado do teste de Tukey para a absorção do Gli (histogramas de cor cinza, Figura 13), quando aplicados separadamente e em mistura, demonstrou diferença apenas para o mutante *yg2*, em que a mistura do Gli com o 2,4-D diminuiu a sua absorção de 94,27% para 89,27%. Ao comparar a absorção com outros mutantes, o *yg2* absorveu menor quantidade de herbicida em relação ao *dgt* (94,14%) e *Nr* (93,02%).

Analisando a translocação de Gli para os tecidos adjacentes (histogramas de cor preta, Figura 13), pode-se perceber que a mistura com 2,4-D proporcionou maior retenção do herbicida na região da folha aplicada para o MT, em que a quantidade de radiação retida passou de 59,22% para 73,82%. Nos mutantes menos sensíveis a auxina, não houve interferência da translocação do Gli quando aplicado com 2,4-D (*dgt* – Gli = 63,65%; Gli + 2,4-D = 67,35%; *Nr* – Gli = 66,83%; Gli + 2,4-D = 60,69%). O *yg2* apresentou resultado contrário daquele observado para o MT, de forma que no mutante a translocação do Gli foi muito pequena (retenção de 80% da radiação no tecido aplicado) quando aplicado sozinho e maior ao ser misturado com 2,4-D (retenção de 65,79% da radiação).

A absorção do ¹⁴C-2,4-D apresentou diferenças estatísticas para todos os fatores e suas interações na análise da variância (Shapiro: p-valor = 0,98 e Bartlett = 0,18) (Anexo – Tabela S18). No primeiro desdobramento da interação entre os tratamentos herbicidas com as plantas

de tomateiro, houve diferença significativa (p-valor menor que 5%, Anexo – Tabela S19). No caso do segundo desdobramento, somente para o MT e *yg2* não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos herbicidas (p-valores maiores que 5%, Anexo – Tabela S20).

Os resultados de translocação não apresentaram diferenças significativas para nenhum fator ou interação, dessa forma todos os valores de translocação do 2,4-D foram iguais para todos os mutantes, mesmo quando misturado com Gli (Anexo – Tabela S21).

Figura 14 - A presença do Gli não altera a translocação do 2,4-D. No quadro acima são apresentadas autorradiografias representativas revelando a absorção e o movimento de ¹⁴C-2,4-D em MT e os mutantes, *diageotropica* (*dgt*), *Never ripe* (*Nr*) e *yellow-green2* (*yg2*), aplicados com as doses de 2,4-D (35 g e,a, ha⁻¹ – 0,65 mM) e glifosato (70 g e,a, ha⁻¹ – 1,7 mM), após 21 dias da aplicação dos herbicidas. As marcações escuras indicam regiões de mais elevada concentração de ¹⁴C-2,4-D no tecido, cada autorradiografia é representativa do perfil obtido em todas as repetições de cada tratamento. Os gráficos de barra com intervalos de confiança representam a quantidade média de radiação absorvida (barras pretas 0 – 100%) e radiação retida no tecido aplicada (barras em cinza – 0 – 100%). A média de cada tratamento são colocadas logo acima da barra correspondente em conjunto com resultados do teste de Tukey em que letras maiúsculas referem-se à comparação entre colunas (vertical) e minúsculas entre linhas (horizontal). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade. Fonte: Piracicaba, 2014

Avaliando os resultados do teste de Tukey para a absorção do 2,4-D sem Gli, os mutantes *dgt* (71,05%) e *yg2* (75,44%) apresentaram menor absorção, no entanto, quando o glifosato foi misturado, a absorção do *dgt* permaneceu como nos demais mutantes (> 88%), o que não aconteceu com o mutante *yg2*, em que a absorção foi semelhante ao 2,4-D aplicado sem mistura (80%) (Figura 14). Os mutantes *dgt* e *Nr* apresentaram menor absorção quando aplicados com 2,4-D sem mistura, porém quando se misturou Gli na formulação, a absorção aumentou para ambos mutantes.

Gli e 2,4-D, apesar de serem transportados pelo simplasto no interior da planta, apresentam padrões de translocação relativamente diferentes. O 2,4-D, por ser uma auxina sintética, caminha célula a célula por transporte polar quimiosmótico (GÄLWEILER et al.,

1998). Em seu transporte, o 2,4-D entra de maneira passiva na célula na forma protonada (2,4-D-H) pelas proteínas carreadoras de influxo AUX1 (AUXIN1) / LAX (LIKE AUX1) (YAMAMOTO; YAMAMOTO, 1998), sendo que no citosol (Ph 7) o herbicida é desprotonado e ânions saem da célula pelos transportadores de efluxo (PIN), concentrados na extremidade oposta a dos carreadores de influxo de cada célula (GOLDSMITH, 1977). A capacidade de determinados carreadores PIN em transportar o 2,4-D é muito baixa, contudo, alguns destes carreadores, como o PIN7, apresentou grande atividade no efluxo da molécula para o exterior da célula (PETRÁŠEK et al., 2006).

O Gli é absorvido por transporte ativo pelos carregadores de fósforo inorgânico (Pi) no interior da célula, seguindo os padrões de translocação da sacarose no interior do floema e caminhando pelos vasos compostos por elementos crivados do floema (MARTIN; EDGINGTONA, 1981). O modelo mais aceito atualmente que explica o transporte de solutos no interior do floema considera que a existência de um gradiente de pressão governado pela concentração do interior das células do tecido vascular permite a entrada da água do xilema para o interior do floema por osmose, gerando um fluxo de massa de água e soluto que transloca das regiões mais concentradas (fontes) para as de menor concentração (drenos) (GOULD et al., 2005). O gradiente de pressão pode ser gerado pelo acúmulo de açúcares, moléculas com carga, sais orgânicos e inorgânicos por meio metabolismo fotossintético e transporte ativo. O 2,4-D também pode ser transportado pelas vias simplásticas com velocidade semelhante ao transporte quimiosmótico (RUTSCHOW; BASKIN; KRAMER, 2011).

Os plasmodesmos são estruturas típicas das células vegetais, tem formato tubular e formam canais que se ligam às células adjacentes. Essas interconexões formam um complexo contínuo, que é responsável pelo transporte de solutos no interior das células, o simplasto. Os plasmodesmos também interconectam as células dos diferentes tecidos que compõem o floema, controlando as moléculas transportadas no seu interior (OPARKA; SANTA CRUZ, 2000). As plantas têm a capacidade de regular a autonomia entre as células alterando as conexões entre os plasmodesmos, permitindo, assim, o regimento das alterações no crescimento e desenvolvimento de tecidos inteiros, produzindo respostas de proteção ante aos estresses ambientais. Essas respostas celulares são reguladas pela ativação de enzimas calose sintase que sintetizam um polissacarídeo denominado β -1,3-glucano (calose) no interior dos plasmodesmos (SIMPSON et al., 2009, BUCHER et al., 2001). O acúmulo de calose e a consequente regulação do fluxo de seiva são induzidos por fortes alterações no estado redox

do interior da célula, causadas principalmente por estresses abióticos e bióticos (BENITEZ-ALFONSO; JACKSON, 2009).

A atuação de herbicidas mimetizadores de auxinas causa inchaço de caules e pecíolos, que levam ao rompimento do xilema, floema e cambio adjacente, de forma que o dano nesses tecidos pode causar redução no transporte do floema. O uso de 2,4-D como herbicida e a sua atuação na célula é intrinsicamente ligado à produção de EROs e à alteração do estado redox do interior da célula (RODRIGUEZ-SERRANO et al., 2014, GROSSMANN, 2010). O 2,4-D tem a capacidade de diminuir o fluxo citoplasmático (RAHMAN et al., 2007). Em estudos com culturas de tecido utilizando 2,4-D como indutor de crescimento de calos (aglomerados de células vegetais), foram observadas modificações nas estruturas das células, principalmente na citolocalização da calose após a aplicação da auxina sintética e, como resultado, foi notado o fechamento das plasmodesmos, quebrando a continuidade do simplasto pela deposição de calose em seu interior (VERDEIL et al., 2001).

De acordo com os resultados de menor translocação do glifosato quando aplicado em conjunto com 2,4-D em MT, é possível atribuir que a auxina sintética estaria provavelmente impedindo a translocação do glifosato pela formação de calose no interior dos plasmodesmos. Isso poderia ser confirmado pelo reestabelecimento da translocação quando foram utilizados os mutantes *dgt* e *Nr*, os quais apresentam menor sensibilidade ao 2,4-D. O mutante *dgt* por apresentar possíveis alterações na via de transdução de sinal envolvendo a ABP1, já o mutante *Nr* apresenta alterações na sinalização de etileno e por consequência sua produção de ABA é menor (HANSEN; GROSSMANN, 2000) (Vide revisão bibliográfica item 2.4.). Essas alterações permitem que cada mutante ao ser tratado com 2,4-D produzam menores quantidades de EROs, uma vez que nesses mutantes os sintomas de oxidação de tecidos é menor (Ver resultados de acúmulo de EROs – item 5.6.2 Figuras 17 e 18), de forma que isso reflita em menor acúmulo de calose e, conseqüentemente, na permanência da atividade dos canais do simplasto, o que reflete na manutenção da translocação do glifosato para outros tecidos da planta mesmo quando aplicado em conjunto com 2,4-D (modelo representativo apresentado pela Figura 15).

Figura 15 - Possível modelo proposto para explicar a menor translocação do Gli quando aplicado com 2,4-D. Na célula companheira constituinte do floema de uma planta apenas aplicada com Gli (célula da esquerda), este é transportado em conjunto com metabólitos, como a sacarose, por meio dos plasmodesmos para os elementos crivados e aí são levados para os tecidos-dreno. Como o Gli em suas primeiras horas de aplicação não altera o ambiente redox do citoplasma, seu movimento no interior dos tecidos é mantido (MARTIN e EDGINGTONA, 1981). A aplicação de 2,4-D (célula da direita) e sua atuação na dinâmica da conformação do citoesqueleto pela ABP1 proporcionam menor movimento e atuação de mitocôndrias e peroxissomos, organelas que estão envolvidas no processo de metabolismo de EROs (Rodriguez-Serrano *et al.*, 2014), que em conjunto com a atuação do 2,4-D no núcleo, induzem a formação e atuação dos hormônios etileno e ABA, ativando rotas metabólicas produtoras de EROs (Grossmann, 2010). Esses dois processos geram estresse oxidativo no interior do citosol. EROs e outras moléculas de sinalização relacionados a mecanismos de defesa ativam proteínas produtoras de calose (calose sintetases). A deposição de calose e alteração do citoesqueleto fecham o interior dos plasmodesmos e bloqueiam o descarregamento de moléculas do metabolismo e do próprio Gli nos elementos crivados do floema, impedindo assim sua translocação para outros tecidos da planta (BENITEZ-ALFONSO; JACKSON, 2009). Fonte: Piracicaba, 2015.

Em relação ao mutante *yg2* que apresentou baixa translocação do glifosato, o processo é pouco claro. No entanto, em estudos envolvendo proteínas cinase indutoras de morte celular programada que conferiam resistência a determinadas doenças em plantas de *Beta vulgaris* L., foram encontrados genes que codificam calose sintetase (*BvCS*) e o Fitocromo A na mesma posição (135 Kb BAC). Dessa forma, a proximidade física desses genes pode resultar em respostas coordenadas frente à pressão gerada por estresses abióticos e bióticos (KUYKENDALL; SHAO, 2011). O mutante *yg2*, devido às mutações inerentes à produção de Heme Oxigênase, precursor da formação do cromóforo dos fitocromos (Ver Revisão Bibliográfica item 2.4.), apresenta apenas 25% da quantidade de Fitocromo A quando comparado ao não mutante (VAN TUINEN et al., 1996), assim, possivelmente deve haver alguma desregulação intrínseca à baixa atividade dos fitocromo que provavelmente altere os padrões de deposição de calose no interior dos plasmodesmos, impedindo a translocação do herbicida.

Outra possibilidade seria a influência das alterações no ciclo circadiano pela disfunção das respostas à luz vermelha e vermelho-distante causada pela mutação na formação do cromóforo do Fitocromo A do *yg2*, que podem causar alterações nos padrões de absorção do Gli pelos carreadores de fosfato existentes na membrana. Foi demonstrado em *Arabidopsis thaliana* a correlação do funcionamento do carreador de fósforo PHT4;1 com a expressão do principal gene associado as oscilações do ciclo circadiano CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) (WANG et al., 2014), gene este que também regula a expressão da EPSPS durante as diferentes fases do dia (SHARKHUU et al., 2014). Todavia, é importante frisar que o PHT4;1 é um carreador presente no tilacóide do cloroplasto e não na membrana plasmática da célula vegetal, por isso suas respostas podem estar ligadas à estrutura em que está presente, não sendo diretamente comparada a outros carreadores presentes em outras estruturas das células.

O glifosato reestabeleceu seu movimento no floema no mutante *yg2* ao ser aplicado com a mistura dos herbicidas, porém as causas desta inversão do comportamento do herbicida no interior dos tecidos também são pouco claras. Auxinas endógenas, como é o caso do 2,4-D, alteram de maneira modesta os genes relacionados com o ciclo circadiano da planta (COVINGTON; HARMER, 2007). Em estudos envolvendo o comportamento de translocação de fósforo inorgânico (Pi) em arroz (*Oryza sativa*) e sua correlação com as auxinas apontam que ARFs apresentam importantes funções no aumento da expressão de transportadores de Pi (WANG et al., 2013). Desse modo, a presença do 2,4-D poderia alterar a dinâmica de

expressão dos carreadores de Pi proporcionando maior entrada de Gli no interior do citosol, mas nada pode ser afirmado com precisão, até porque a absorção do herbicida foi menor somente para este mutante quando misturado com 2,4-D (Figura 13).

A translocação do 2,4-D seguiu o mesmo padrão em todos os mutantes e isso se deve, provavelmente, ao transporte polar que se mantém o mesmo se a via simplástica for interrompida. Contudo, não existem informações claras na literatura se há ligação ou interdependência do funcionamento de ambos os transportes. O que se postula é a competição entre o transporte das auxinas pelos plasmodesmos e as proteínas PIN, sendo que as proporções transportadas para cada meio dependem do tipo de célula, bem como seu estágio de desenvolvimento (RUTSCHOW et al., 2011).

5.6 Parâmetros bioquímicos e genéticos da interação de 2,4-D e Gli

5.6.1 Atuação do glifosato na via de sinalização de auxina no núcleo

Pelas análises histoquímicas da expressão do gene DR5 marcado pelo gene repórter GUS, é possível analisar na planta controle a expressão do gene apenas nos meristemas radicular e apical, caracterizados pela atuação natural das auxinas endógenas das zonas de crescimento. No tratamento em que se aplicou Gli, é possível analisar traços de expressão do gene DR5 nos cotilédones e meristemas, provavelmente pelo efeito estimulante de crescimento que o Gli pode causar inicialmente nos tecidos aplicados (VELINI et al., 2010).

No tratamento em que foi aplicado 2,4-D, a expressão do gene DR5 foi muito alta, uma vez que todos os tecidos apresentaram coloração forte, bem como epinastia dos cotilédones. Quanto à mistura do Gli, as respostas de expressão do gene DR5 foram atenuadas, uma vez que com a combinação dos herbicidas, os cotilédones das plântulas não apresentaram coloração nem epinastia. A coloração azulada da marcação com o GUS foi menor na região do caulículo e no meristema radicular, provando assim a interferência do Gli na atuação do 2,4-D nos mecanismos de sinalização das auxinas existentes no núcleo.

A inibição de rotas de biossíntese pode alterar a expressão de genes não relacionados somente com a rota específica em que o herbicida atua, mas também em vias de regulação metabólicas distintas não relacionadas ao seu site de atuação. Em estudos sobre os mecanismos moleculares da atuação do Gli em soja (*Glycine max* (L.) Merrill), uma série de genes que estavam relacionados com mecanismos de ação de outros herbicidas foram inibidos, inclusive genes relacionados à via de ubiquitinação do SCF^{TIR/AFB}. Foram

encontrados sete genes relacionados aos ARF onde quatro eram infrarregulados e três suprarregulados (JIANG et al., 2013).

Figura 16 - A expressão do gene responsivo à auxina é reduzida quando o herbicida 2,4-D é aplicado em conjunto com glifosato. A figura representa a expressão do gene repórter GUS em diferentes partes das plântulas do mutante Micro-Tom (MT) - DR5:GUS aplicadas com 2,4-D (0,65 mM) e glifosato (1,7 mM) após três dias da aplicação. Em todos os tratamentos é mostrado o perfil geral da plântula, e ao lado ampliação do meristema radicular e meristema apical. As figuras ilustram o perfil geral dos resultados de cada tratamento. As barras de escala presentes nas figuras do MT controle são representativas para todas as imagens da figura; a primeira barra corresponde à 2 mm, a segunda e a terceira à 1 mm. Fonte: Piracicaba, 2014

Avaliando a resposta à ação do 2,4-D em mutantes de *Arabidopsis* no complexo SCF^{TIR/AFB}, o único mutante que apresentou maior insensibilidade ao herbicida foi o que apresentava rompimento na sinalização do TIR1, de modo que em relação aos demais mutantes para AFBs as respostas não foram alteradas (GLEASON; FOLEY; SINGH, 2011). Outros experimentos apontaram que a afinidade de ligação entre os receptores TIR/AFB e AUX/IAA utilizando a auxina IAA, foi concluído que as proteínas TIR1 apresentavam capacidade de se ligarem e degradarem os IAA 3, 7, 8 e 28, que reprime o ARF 19, sendo que o TIR1 também degrada o IAA 5 que reprime os ARFs 10, 16 e 19 (VILLALOBOS et al., 2012). A ativação transicional realizada pelos ARFs é regulada por duas classes diferentes: os ARFs positivos e negativos, que competem pelos sítios de ligação dos genes promotores relacionados às auxinas, de forma que os negativos impedem a codificação dos genes e os positivos as induzem. Em soja, a atuação do Gli induziu a suprarregulação do ARF 16 (Log₂ “fold change” = 33,04) e a infrarregulação do ARF 10 (Log₂ “fold change” = - 33,72), ambos negativos. O herbicida também induziu a suprarregulação do ARF positivo 19 (Log₂ “fold

change” = 3,96) (JIANG et al., 2013). A maior e menor ativação dos diferentes ARFs na via de sinalização SCF^{TIR/AFB} induzidos pelos efeitos moleculares da atuação do Gli, pode provavelmente alterar o nível de expressão de genes como o DR5, como foi demonstrado acima (Figura 16), bem como os genes relacionados à síntese de etileno e ABA, que por sua vez atuam como sinalizadores químicos induzindo à produção de EROs e diminuindo os efeitos fitotóxicos do 2,4-D na célula. No entanto, é importante considerar que essas interações entre TIR/AFBs e os AUX/IAA foram realizadas em *Arabidopsis*, utilizando-se como fonte de auxina o ácido indolacético e as mudanças que o Gli impõe foram estudadas em plantas de soja, de forma que os dois experimentos que não podem ser diretamente comparadas entre si e nem estendidas para o MT, mas podem servir como pista para explicação da menor expressão do gene DR5 encontrada neste trabalho. Outro sinal de que a expressão de genes induzidas pelo Gli possa alterar a atuação do 2,4-D diz respeito aos resultados dos experimentos de eficácia de controle no mutante *yg2* em que a falta de atuação do Gli induziu ao reestabelecimento da fitotoxidade do 2,4-D (Item 5.4.). O mesmo foi encontrado nos ensaios detecção de EROs no *yg2*, conforme será discutido no próximo item.

5.6.2 Produção de espécies reativas de oxigênio

A super produção de espécies reativas de oxigênio induzida pelo 2,4-D já é conhecida e reportada para diferentes espécies de plantas (GROSSMANN; KWIATKOWSKI; TRESCH, 2001; ROMERO-PUERTAS et al., 2004, PAZMIÑO et al., 2011). Comparando os resultados da produção de EROs no MT a aparente produção de H₂O₂ é baixa, uma vez que os cotilédones, meristema e raiz não apresentam traços fortes de coloração amarronzada. Quanto a O₂^{•-} é possível detectar pequenos traços nas bordas dos cotilédones, na ponta do meristema apical e fortes marcações na raiz, principalmente no meristema radicular. A aplicação do Gli no MT induziu à produção de H₂O₂ nos cotilédones e no ápice da radícula, no entanto no meristema apical não apresentou coloração marrom escura. No caso do O₂^{•-} a produção seguiu como no controle. No tratamento com 2,4-D, H₂O₂ e O₂^{•-} foram produzidos em grande quantidade nos cotilédones, entretanto o O₂^{•-} se manifestou mais nos meristemas radicular e apical em relação ao H₂O₂, uma vez que para este não são notadas grandes marcações para nessa última ERO. Na mistura dos herbicidas, as marcações de ambos os tratamentos foram menores tanto para o Gli, quanto para o 2,4-D, quando se analisa os cotilédones e meristemas apicais. No caso da radícula, o H₂O₂ não apresentou diferença entre os tratamentos com os outros herbicidas, mas no O₂^{•-} a coloração foi menor.

Para o mutante *dgt* os cotilédones, caulículos e meristema apical apresentaram coloração como no MT, já a radícula apresentou cor escurecida indicando grande produção de H_2O_2 . A produção de $O_2^{\cdot-}$ também não foi muito manifestada neste mutante, mas foi possível observar certa coloração no caulículo, o que não foi observado no MT. A aplicação do Gli não se diferenciou muito com MT tanto para H_2O_2 , quanto para $O_2^{\cdot-}$. No tratamento com 2,4-D, a produção de EROs foi bem menor que no MT, uma vez que os traços de marcação de H_2O_2 foram discretos e a coloração azulada do $O_2^{\cdot-}$ foi mais fraca, não se manifestando em toda área do cotilédone, visto que foi possível analisar áreas sem marcação nesses tecidos. A coloração de H_2O_2 na raiz foi forte seguindo o padrão da testemunha do *dgt*. No meristema apical, em ambas análises de EROs não foram encontradas marcações para o tratamento com a auxina sintética. A mistura também seguiu o padrão do tratamento com 2,4-D, mas para o meristema radicular a coloração de H_2O_2 foi a menor dentre todos os tratamentos aplicados no mutante.

A testemunha do mutante *Nr* seguiu os mesmos padrões do *dgt*, o ápice do meristema radicular apresentou também coloração mais intensa, mas na raiz a produção de H_2O_2 não foi tão escura quanto no outro mutante insensível à auxina. No tratamento com o Gli, a única característica que variou em relação ao MT e *dgt* na produção de H_2O_2 foi no meristema apical em que a coloração foi mais intensa e no meristema radicular foi menor. As marcações de $O_2^{\cdot-}$ foram semelhantes ao MT e *dgt* exceto no meristema apical que no *Nr* apresentou coloração mais intensa. Nos tratamentos com 2,4-D, o perfil de produção de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ foi semelhante ao *dgt*, também não houve variação entre os dois mutantes na mistura dos herbicidas, no entanto, para o *Nr* foram observadas maiores marcações para H_2O_2 em relação ao *dgt*.

O mutante *yg2* exibiu perfis de produção de EROs diferentes do MT e demais mutantes. Na testemunha o mutante apresentou traços de H_2O_2 nos cotilédones e radícula, mas no meristema apical não houve manifestação. A marcação do $O_2^{\cdot-}$ foi muito intensa nos cotilédones e meristemas radiculares indicando alto ambiente oxidativo ocorrente de forma natural nas células deste mutante. Com a aplicação do Gli, a produção de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ foi menor que na testemunha do *yg2*, uma vez que a coloração nos cotilédones e meristema apical foi a menos intensa de todo o experimento. O 2,4-D proporcionou produção de ambas as EROs estudadas semelhantes ao MT, entretanto a intensidade da coloração nos tecidos foi menor. Na mistura dos herbicidas as plântulas de *yg2*, quando comparadas com os demais mutantes apresentaram coloração com maior intensidade, com exceção do ápice radicular onde a coloração foi igual ao MT para H_2O_2 e de intensidade bem baixa para o $O_2^{\cdot-}$.

Figura 17 - Localização histoquímica de H_2O_2 em diferentes partes das plântulas do mutante MT – Micro-Tom; *dgt* – *diageotropica*; *Nr* – *Never rip*; *yg2* – *yellow-green2*, aplicados com 2,4-D (0,65 mM) e glifosato (1,7 mM) após três dias da aplicação. Em todos os tratamentos é mostrado o perfil geral da plântula, e ao lado ampliação do meristema radicular e meristema apical. As barras de escala presentes nas figuras do MT controle são representativas para todas as imagens da figura; a primeira barra corresponde à 2 mm, a segunda e a terceira à 1 mm. Fonte: Piracicaba, 2015

Figura 18 - Localização histoquímica de $O_2^{\cdot -}$ em diferentes partes das plântulas do mutante MT – Micro-Tom; *dgt* – *diageotropica*; *Nr* – *Never rip*; *yg2* – *yellow-green2*, aplicadas com 2,4-D (0,65 mM) e glifosato (1,7 mM) após três dias da aplicação. Em todos os tratamentos é mostrado o perfil geral da plântula, e ao lado ampliação do meristema radicular e meristema apical. As barras de escala presentes nas figuras do MT controle são representativas para todas as imagens da figura; a primeira barra corresponde à 2 mm, a segunda e a terceira à 1 mm. Fonte: Piracicaba, 2015

Os resultados descritos acima estão relacionados com os resultados encontrados nos estudos de expressão do gene DR5 na via de sinalização das auxinas (Item 5.6.1, figura 16) em que no MT, quando tratado com 2,4-D, apresentou grande expressão do gene, enquanto que na mistura com o Gli, a expressão foi menor. Nos resultados da produção de EROs, o MT seguiu o mesmo padrão, ou seja, grande coloração dos marcadores H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$ na aplicação de 2,4-D e menor marcação na mistura, confirmando assim a interferência do Gli na rota de atuação do 2,4-D, diminuindo o poder oxidativo deste último. Esses resultados também se assemelham com os encontrados nos ensaios de eficácia de controle nos tratamentos herbicidas (Item 5.4, Figura 12).

Nos mutantes *Nr* e *dgt*, o efeito do 2,4-D na produção de EROs foi atenuado. O mutante *Nr*, no tratamento em que se aplicou a mistura dos herbicidas, apresentou maior produção de H_2O_2 em relação ao *dgt*, e da mesma forma que no item 5.4, a eficácia de controle da mistura dos herbicidas foi maior para o *Nr*. A maior sensibilidade a estresses oxidativos do *Nr* em relação ao *dgt* foi reportada em estudos avaliando a susceptibilidade dos mutantes na presença de Cadmo, em que o mutante insensível ao etileno produziu maior quantidade de H_2O_2 . Nas conclusões deste trabalho, foi feita a proposição que o *Nr* não é totalmente insensível ao etileno (GRATAO et al., 2012).

Sobre condições fisiológicas normais, a produção das EROs H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$ são controladas por enzimas catalases, ascorbase peroxidase e superoxide dismutase, presentes nos peroxissomos. A proliferação dos peroxissomos em *Arabidopsis* é regulada pela proteína Perixina 11b, que é ativada pelo fitocromo A na presença da luz da região do vermelho distante (DESAI e HU, 2008). Nos mutantes *yg2* como a produção do Fitocromo A é comprometida, possivelmente a produção de peroxissomos e outras organelas que atuam como anti-oxidantes no interior da célula é afetada, levando aos resultados encontrados de alta produção natural de EROs no interior dos tecidos.

O Gli induz à produção de H_2O_2 (AHSAN et al., 2008). Em estudos realizados em soja sugerem que o Gli causa oxidação transitória mas não permanente nas células das folhas. Essa alteração seria suficiente para ativar os mecanismos para a síntese de enzimas antioxidantes (as mesmas mencionadas acima), que teriam capacidade de restaurar o ambiente redox da célula (VIVANCOS et al., 2011). O Gli diminuiu a produção de EROs no *yg2*, isso pode estar associado à ativação de mecanismos antioxidantes na célula. A menor capacidade do herbicida em atuar neste mutante pode estar relacionada com essas alterações do estado redox.

Nos tratamentos com 2,4-D e a mistura dos herbicidas, os resultados encontrados para o *yg2* também foram semelhantes aos ensaios de eficácia de controle (Item 5.4, Figura 12),

demonstrando mais uma vez que a atuação do Gli reduz a atuação do 2,4-D, provavelmente por genes ativados pelo Gli, como já discutido nos experimentos de expressão gênica (Item 5.6.1).

5.6.3 Acúmulo de ácido chiquímico

Todos os resultados de acúmulo de ácido chiquímico para o MT e os mutantes atenderam as pressuposições do modelo apresentando sempre valores-p maiores que 5% no teste de homogeneidade de variâncias e normalidade dos resíduos.

Os resultados da análise de variância apontaram diferença estatística no acúmulo de ácido chiquímico em cada tratamento com herbicida, bem como nos diferentes dias de avaliação e na interação entre os diferentes dias e tratamentos herbicidas, sendo que isso foi observado para o MT e todos os mutantes (Anexo – Tabelas S22, S27, S32 e S38).

No MT e *dgt*, os resultados da análise do desdobramento não apresentaram diferença estatística no acúmulo de ácido chiquímico para os diferentes dias de avaliação no tratamento com 2,4-D, mas para os tratamentos de Gli e 2,4-D + Gli houve diferença significativa nos diferentes períodos (Anexo – Tabelas S33 e S38). Nos mutantes *Nr* e *yg2*, todos os tratamentos herbicidas apresentaram diferença estatística para os diferentes dias de avaliação (Anexo – tabelas S33 e S39).

Os resultados das diferentes análises de regressão e ajuste dos modelos demonstraram que o comportamento do acúmulo de ácido chiquímico para a maioria dos tratamentos com herbicidas nos diferentes dias de avaliação foram significativos (valor-p < 0,01) para efeito polinomial quadrático. Os modelos quadráticos foram ajustados para os tratamentos de Gli com e sem mistura para o MT, *dgt*, e *Nr* (Anexo – Tabelas S24, S25, S29, S30, S34, S36). No mutante *yg2*, todos os tratamentos com herbicidas também foram melhor ajustados seguindo o modelo quadrático (Anexo – Tabelas S40, S41, S42). O único tratamento herbicida em que o ajuste apresentou diferença significativa apenas para o modelo linear, foi o 2,4-D aplicado em *Nr* (Anexo – Tabela S35 – ajuste linear, p-valor < 0,01 e ajuste quadrático, p-valor = 0,21). Na Figura 19, foram representadas graficamente cada um dos modelos obtido pelas análises de regressão.

Para que as diferenças entre os tratamentos herbicidas nos dias de avaliação pudessem ser comparadas entre si, foi feita outra análise do desdobramento das médias de acúmulo de ácido chiquímico, mas desta vez comparando nos diferentes dias de avaliação as diferenças

entre os tratamentos com Gli, 2,4-D e suas misturas. Os resultados demonstraram diferença estatística significativa (valor- $p < 0,01$) entre os tratamentos herbicidas para todos os dias de avaliação no MT e em todos os mutantes de tomateiro estudados (Anexo – Tabelas S26, S31, S37, S43). Para identificar essas diferenças foi aplicado o teste de Tukey (Tabela 6).

Tabela 6 - Comparação de médias do acúmulo de ácido chiquímico nos diferentes dias de avaliação em plantas de MT e mutantes de tomateiro (*diageotropica* (*dgt*), *Never ripe* (*Nr*) e *yellow-green2* (*yg2*)) tratadas com Gli, 2,4-D e sua mistura. Fonte: Piracicaba, 2015

Dias após o tratamento (DAT)									
Herbicidas	7			14			21		
	$\mu\text{g g}^{-1}$								
	MT (médias/desvio padrão)								
Gli	2,47	0,32	A*	2,58	0,38	A	1,57	0,19	A
2,4-D	0,09	0,14	C	0,18	0,09	C	0,30	0,05	B
Gli + 2,4-D	0,54	0,21	B	0,93	0,33	B	1,90	0,35	A
<i>dgt</i>									
Gli	1,62	0,31	A	2,05	0,26	A	1,49	0,19	A
2,4-D	0,20	0,26	C	0,40	0,10	B	0,40	0,08	C
Gli + 2,4-D	0,89	0,21	B	1,58	0,32	A	0,77	0,11	B
<i>Nr</i>									
Gli	1,90	0,18	A	2,19	0,09	A	1,38	0,32	A
2,4-D	0,18	0,16	C	0,57	0,13	B	0,73	0,10	B
Gli + 2,4-D	1,43	0,26	B	1,96	0,15	A	1,23	0,10	A
<i>yg2</i>									
Gli	0,88	0,05	B	1,44	0,07	B	1,28	0,01	A
2,4-D	0,10	0,11	C	0,93	0,11	C	0,86	0,08	B
Gli + 2,4-D	1,36	0,04	A	2,17	0,34	A	0,98	0,16	B
CV MT = 21.85%		CV <i>dgt</i> = 21,14%		CV <i>Nr</i> = 14.03%		CV <i>yg2</i> = 12.82%			

*As letras maiúsculas referem-se à comparação entre colunas (vertical), médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade. Os resultados para cada MT e mutantes são independentes, não podendo ser comparadas entre si.

A atuação do Gli no MT, *dgt* e *Nr* apresentou grande acúmulo de ácido chiquímico até os 14 DAT (MT - $2,58 \mu\text{g g}^{-1}$; *dgt* - $2,05 \mu\text{g g}^{-1}$; *Nr* - $2,19 \mu\text{g g}^{-1}$). Após esse período, a maior parte das plantas aplicadas demonstrou decréscimo na quantidade do ácido acumulado, isso ocorreu provavelmente pela injúria crônica no metabolismo induzida pelo herbicida (MT - $1,57 \mu\text{g g}^{-1}$; *dgt* - $1,49 \mu\text{g g}^{-1}$; *Nr* - $1,38 \mu\text{g g}^{-1}$). O *yg2*, no entanto, não apresentou grande decréscimo no acúmulo de ácido chiquímico, devido à baixa sensibilidade do mutante ao Gli. Nos tratamentos em que foram aplicados 2,4-D, o MT e *Nr* permaneceram com baixos níveis de ácido chiquímico acumulado durante todos os dias avaliados sem variações significativas

(Anexo – Tabelas S23 e S28), demonstrando que a atuação do herbicida não altera em nada a rota do ácido chiquímico. Contudo, nos mutantes *Nr* e *dgt*, os níveis quantificados do ácido foram elevados no decorrer das avaliações, passando de $0,18 \mu\text{g g}^{-1}$ na primeira avaliação para $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ aos 21 DAT, no caso do *Nr*. O *yg2*, por sua vez, teve comportamento semelhante passando de $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ aos 7 DAT para $0,86 \mu\text{g g}^{-1}$ aos 21 DAT.

Figura 19 - Resultados da quantificação do acúmulo de ácido chiquímico vegetal em MT e mutantes de tomateiro aplicados com 2,4-D (0,65 mM) e glifosato (Gli) (1,7 mM) e sua mistura, avaliados aos 7, 14 e 21 DAT. Resultados em μg de ácido por g de tecido. Fonte: Piracicaba, 2014

O MT, quando aplicado com Gli e 2,4-D em mistura, apresentou menor acúmulo de ácido chiquímico até os 14 DAT (7 DAT - $0,54 \mu\text{g g}^{-1}$ e 14 DAT - $0,93 \mu\text{g g}^{-1}$). Após esse período, os níveis apresentam acréscimo, de forma que aos 21 DAT, os níveis dos tratamentos de Gli com e sem mistura de 2,4-D não apresentaram diferença estatística (Gli - $1,57 \mu\text{g g}^{-1}$; Gli + 2,4-D - $1,90 \mu\text{g g}^{-1}$).

No caso dos mutantes pouco sensíveis a atuação dos herbicidas, *Nr* e *dgt*, nos tratamentos em que foram aplicados Gli sem mistura e em conjunto com 2,4-D, as diferenças observadas no acúmulo de ácido chiquímico aparentemente diminuíram, demonstrando o impacto dos efeitos do 2,4-D sobre a atuação do Gli. No mutante *Nr* foi observada diferença estatística somente na primeira avaliação, onde o acúmulo do ácido foi maior quando o Gli

foi aplicado sem mistura, já nas avaliações seguintes não houve diferença entre os dois tratamentos, de forma que a menor sensibilidade de etileno neste mutante induziu a maior atuação do Gli em seu sítio de ação. No mutante *dgt* o único período em que o acúmulo não apresentou diferença estatística foi ao 14 DAT, nos outros períodos, no entanto, a diferença de ácido acumulado foi grande (7 DAT 1,62 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Gli e 0,89 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Gli + 2,4-D; 14 DAT 1,49 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Gli e 0,77 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Gli + 2,4-D) demonstrando que a via de sinalização alterada no mutante não é aparentemente a que influência mais no antagonismo que o 2,4-D causa no Gli, diferentemente do *Nr*.

Com relação ao mutante *yg2*, as respostas foram contrárias ao MT, uma vez que o aumento de ácido chiquímico foi maior quando o Gli foi misturado com 2,4-D do período de 7 a 14 DAT (7 DAT - 0,88 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Gli e 1,44 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Gli + 2,4-D; 14 DAT - 1,36 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Gli e 2,17 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Gli + 2,4-D). Os valores de acúmulo do ácido foram se aproximando até que suas médias se tornaram semelhantes às médias do tratamento em que foi aplicado somente 2,4-D (0,86 $\mu\text{g g}^{-1}$ para 2,4-D e 0,98 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Gli + 2,4-D), que apresentou a quantidade de ácido chiquímico acumulado naturalmente pelas plantas. O tratamento com Gli sem mistura apresentou maior acúmulo de ácido chiquímico (1,28 $\mu\text{g g}^{-1}$). O acúmulo do ácido decresceu para esse mutante, não pela falha do metabolismo induzida pelo herbicida como nos outros mutantes, mas sim pela sua maior insensibilidade ao Gli, pois apesar de ter sofrido clorose, característica da atuação do herbicida, os sintomas de senescência foliar não foram manifestos, de modo que a planta provavelmente se recuperou da atuação do herbicida após os 7 dias (Ver os sintomas entre as diferentes plantas de tomateiro aplicadas com Gli pela Figura 12).

A redução no acúmulo de ácido chiquímico induzida pelo 2,4-D pode estar relacionada à menor translocação do Gli, uma vez que sua menor translocação reflete na concentração menor no interior do simplasto. Os parâmetros de acúmulo do ácido seguiram relação direta com a absorção do Gli, ou seja, em todos os tratamentos em que houve translocação da folha aplicada para outros tecidos, que é o caso do MT tratado com Gli; *yg2* com Gli + 2,4-D; *Nr* e *dgt* tratados com Gli e Gli + 2,4-D (Figuras 13 e 19), apresentaram aumento no acúmulo de ácido chiquímico.

Um fator que pode ter também proporcionado a redução do acúmulo de ácido chiquímico pela atuação do 2,4-D, foi provavelmente a alteração do ambiente redox provocada pela atuação da auxina sintética. Trabalhos estudando a atuação do Glu em plantas irrigadas com altas concentrações de H_2O_2 induziram à menor toxicidade do herbicida. Utilizando-se técnicas de Docagem Molecular (“Docking”) foi postulado que EROs, geradas

por H_2O_2 , agem como aceptores de elétrons que atuam na via de ligação da EPSPS e na sua degradação. Isso ocorre porque as moléculas de H_2O_2 têm capacidade de bloquear a cavidade ativa da EPSPS, impedindo a entrada do Gli em seu site de ligação (TYAGI et al., 2012). No presente trabalho, os mutantes *dgt* e *Nr* apresentaram valores próximos de acúmulo do ácido chiquímico quando Gli foi aplicado separadamente e em mistura com 2,4-D. Como, provavelmente, esses mutantes apresentam menor oxidação de tecidos (Figuras 17 e 18), o Gli atuou com menor interferência da atuação de H_2O_2 . No mutante *Nr*, o acúmulo de ácido chiquímico foi o que menos se diferenciou entre os tratamentos de Gli e Gli + 2,4-D, demonstrando que a interferência do 2,4-D na atuação do Gli deve estar muito mais relacionada com a via de sinalização no núcleo do complexo $SCF^{TIR/AFB}$ e com a produção do hormônio etileno e de ABA (HANSEN e GROSSMANN, 2000), do que com o estresse oxidativo causado na via da ABP1.

Como já discutido (Revisão Bibliográfica Item 2.4.), as alterações causadas no cromóforo do Fitocromo B em *Arabidopsis* mostraram menor sensibilidade ao Gli (SHARKHUU et al., 2014) e, provavelmente, essas mudanças se assemelham às alterações de cromóforo do Fitocromo A do mutante *yg2*, o qual também apresentou menor acúmulo de ácido chiquímico (Figura 19). No caso da mistura entre Gli e 2,4-D aplicada no mutante que apresentou aumento do ácido, não foram encontradas informações na literatura que apresentassem alguma referência ou resultados relacionados ao que foi encontrado. O mais provável é que o aumento do ácido chiquímico seja em decorrência do próprio aumento da translocação, como já foi discutido anteriormente neste tópico.

6 CONCLUSÕES

Diante de todos os resultados apresentados, é possível concluir que entre as formulações de herbicidas não existem mudanças significativas no deslocamento químico dos átomos de hidrogênio dos herbicidas 2,4-D e Gli, bem como na região do fósforo das moléculas Gli, quando se considera apenas os principais cátions contra-íon das diferentes formulações (isopropilamina, dimetilamina, potássio e amônio). As formulações comerciais de Gli sal de amônio sobre a forma de granulado dispersível apresentaram deslocamento químico principalmente para a região do fósforo das moléculas Gli. Essa formulação também apresentou altos teores de sódio, quando comparadas as outras que estão na forma de líquido dispersível.

O Gli, em suas as formulações de sal dimetilamina e sal de potássio, apresenta absorção equivalente tanto quando eram aplicadas separadamente, quanto em mistura com o 2,4-D. No caso da formulação dimetilamina, a mistura com 2,4-D induziu ao incremento de 10% na absorção. A formulação Gli sal de amônio diminuiu a absorção do herbicida, mas esta foi restaurada se misturada com as formulações de 2,4-D.

A absorção do 2,4-D colina é maior que a dimetilimina, quando aplicado sem ser misturado com outros herbicidas. Na formulação dimetilamina, a mistura com o Gli propicia aumento da absorção do 2,4-D em todas as formulações, com exceção da formulação Gli sal de amônio, em que a absorção é equivalente quando o 2,4-D é aplicado sem mistura.

A dose de maior antagonismo entre os herbicidas para o MT foi de 70 g i.a. ha⁻¹ para o Gli e de 35 g i.a. ha⁻¹ para 2,4-D. No MT, o antagonismo ocorre pela menor translocação do Gli, quando este foi misturado com 2,4-D, o acúmulo de ácido chiquímico também foi menor na mistura dos herbicidas. A translocação do 2,4-D não foi alterada quando aplicada com Gli, mas a mistura dos dois herbicidas acarretou em menor atividade da transcrição de genes relacionados as auxinas, em especial o DR5. A produção de EROs no MT aplicado com 2,4-D foi maior que quando foi aplicada a mistura dos herbicidas.

Nos mutantes *dgt* e *Nr* os tecidos são menos oxidados pela ação do 2,4-D em plantas adultas. A produção de EROs em plântulas de *dgt* foram iguais no tratamento com 2,4-D e na mistura de 2,4-D e Gli. No mutante *Nr*, a produção de EROs foi semelhante ao *dgt*, com exceção do H₂O₂, que foi maior na mistura de 2,4-D e Gli, quando comparada a aplicação do 2,4-D sem mistura. Para ambos mutantes, a translocação do Gli foi mantida quando aplicado em conjunto com 2,4-D, elucidando assim a interferência deste último na translocação do Gli.

A quantidade de ácido chiquímico acumulado nos tratamentos de Gli e Gli + 2,4-D não apresentou diferença no mutante *Nr* aos 14 e 21 dias de avaliação, já para o mutante *dgt*, o mesmo ocorreu apenas aos 14 dias.

O mutante *yg2* foi pouco sensível ao Gli, de modo que a fototoxicidade entre os tratamentos aplicados com 2,4-D e este em mistura, apresentou controle equivalente sem que ocorresse aparente antagonismo como no MT. A translocação do Gli no *yg2* foi baixa, porém com a aplicação do 2,4-D a translocação foi reestabelecida. O acúmulo de ácido chiquímico apresentou o mesmo comportamento: quando o mutante foi aplicado somente com o Gli, a quantidade de ácido acumulado foi menor, mas quando aplicado em conjunto com 2,4-D a atividade do Gli foi reestabelecida e o ácido chiquímico acumulado foi maior. Foram encontradas altas quantidades de EROs produzidas naturalmente no mutante e na aplicação com Gli, a produção de EROs decaiu. Nos tratamentos com 2,4-D aplicados sem mistura e misturados com Gli a produção de H_2O_2 foi semelhante, já a produção de $O_2^{\cdot-}$ foi maior quando as plântulas foram aplicadas com a mistura dos herbicidas.

REFERÊNCIAS

- AHSAN, N.; LEE, D.G.; LEE, K.W.; ALAM, I.; LEE, S. H.; BAHK, J.D.; LEE, B.H.; Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 46, p. 1062-1070, 2008.
- AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A.M. Phytoalexins in defense against pathogens. **Trends in Plant Science**, London, v. 17, p. 73-90, 2012.
- AMRHEIN, N.; DEUS, B.; GEHRKE, P.; STEINRUCKEN, H. C.; The Site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate: II. Interference of glyphosate with chorismate formation in vivo and in vitro. **Plant Physiology**, Rockville, v. 66, p. 830-834. 1980.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS DEFENSIVOS GENÉRICOS. Disponível em: <<http://www.aenda.org.br/>>. Acesso em: 23 jul. 2013,
- AYRES, M.P.; CLAUSEN, T.P.; MACLEAN, S.F.J.; REDMAN, A.M.; REICHARDT, P.B. Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. **Ecological Society of America**, Washington, v. 78, n. 6, p. 1696-1712, 1997.
- BABST, B.A.; CHEN, H.Y.; WANG, H.Q.; PAYYAVULA, R.S.; THOMAS, T.P.; HARDING, S.A.; TSAI, C.J. Stress-responsive hydroxycinnamate glycosyltransferase modulates phenylpropanoid metabolism in *Populus*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, p. 4191-4200, 2014.
- BADESCU, G.O.; NAPIER R.M. Receptors for auxin: will it all end in TIRs? **Trends in Plant Science**, London, v. 11, p. 217–223. 2006.
- BENDER, S.L.; MEHDI, S.; KNOWLES, J.R. Dehydroquinase synthase: the role of divalent metal cations and of nicotinamide adenine dinucleotide in catalysis. **Biochemistry**, Washington, v. 28, p. 7555-7560, 1989..
- BERKEN, A.; WITTINGHOFER, A. Structure and function of Rho-type molecular switches in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 46, p. 380–393, 2008.
- BENITEZ-ALFONSO, Y.; JACKSON, D.; Redox homeostasis regulates plasmodesmal communication in *Arabidopsis* meristems. **Plant Signaling and Behavior**, Georgetown, v. 7, p. 655-659, 2009.
- BOOCOCK, M.R.; COGGINS, J.R. Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 154, p. 127-133, 1983.
- BRECKE, B.J.; DUKE, W.B. Effect of glyphosate on intact bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) and isolated cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 66, p. 656-659, 1980.
- BROMILOW, R.H.; CHAMBERLAIN, K. The herbicide glyphosate and related molecules: physicochemical and structural factors determining their mobility in phloem. **Pest Management Science**, Sussex, v. 56, p. 368-373, 2015.

BUCHER, G.L.; TARINA, C.; HEINLEIN, M. Local expression of enzymatically active class I β -1, 3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco. **The Plant Journal**, Oxford, v. 28, p. 361-369, 2001.

CAMPOS, M.L.; CARVALHO, R.F.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E. Small and remarkable: the Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. **Plant Signaling and Behavior**, Georgetown, v. 5, p. 267-270, 2010.

CARVALHO, R.F.; CAMPOS, M.L.; PINO, L.E.; CRESTANA, S.L.; ZSOGON, A.; LIMA, J.E.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. **Plant Methods**, London, v. 18, p. 1-14, 2011.

CHRISTIAN, M.; STEFFENS, B.; SCHENCK, D.; LUTHEN, H. The diageotropica mutation of tomato disrupts a signalling chain using extracellular auxin binding protein 1 as a receptor. **Planta**, Berlin, v. 218, p. 309-314, 2003.

COLBY, S.R.; WOJTASZEK, T.; WARREN, G.F. Synergistic and antagonistic combinations for broadening herbicidal selectivity. **Weeds**, Lawrence, v. 13, p. 87-91, 1965.

CONSONNI, C.; BEDNAREK, P.; HUMPHRY, M.; FRANCOCCI, F.; FERRARI, S.; HARZEN, A.; VER LOREN VAN THEMAAT, E.; PANSTRUGA, R. Tryptophan-derived metabolites are required for antifungal defense in the *Arabidopsis* mlo2 mutant. **Plant Physiology**, Rockville, v. 152, p. 1544-1561, 2010.

COVINGTON, M.F.; HARMER, S.L. The circadian clock regulates auxin signaling and responses in *Arabidopsis*. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 5, p. 222, 2007.

DAVIS, S.J.; BHOO, S.H.; DURSKI, A.M.; WALKER, J.M.; VIERSTRA, R.D. The heme-oxygenase family required for phytochrome chromophore biosynthesis is necessary for proper photomorphogenesis in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, p. 656-669, 2001.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMENEZ, A.R.; PAREDES-LOPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains--characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Amherst, v. 40, p. 173-289, 2000.

DENIS, M.H.; DELROT, S. Carrier-mediated uptake of glyphosate in broad bean (*Vicia faba*) via a phosphate transporter. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 87, p. 569-575, 2015.

DESAI, M.; HU, J. Light Induces Peroxisome Proliferation in *Arabidopsis* Seedlings through the Photoreceptor Phytochrome A, the Transcription Factor HY5 HOMOLOG, and the Peroxisomal Protein PEROXIN11b. **Plant Physiol**, Rockville, v. 146, n. 3, p. 1117-27, 2008.

ENTUS, R.; POLING, M.; HERRMANN, K.M. Redox regulation of *Arabidopsis* 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, p. 1866-1871, 2002.

FERRARI, S.; PLOTNIKOVA, J.M.; DE LORENZO, G.; AUSUBEL, F.M. *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. **The Plant Journal**, Oxford, v. 35, p. 193-205, 2003.

FLINT, J.L.; BARRETT, M. Antagonism of glyphosate toxicity to johnsongrass (*Sorghum halepense*) by 2,4-D and dicamba. **Weed Science**, Lawrence, v. 37, p. 700-705, 1989.

FLINT, J.L.F.; CORNELIUS, P.L.; BARRETT, M. Analyzing herbicide interactions: a statistical treatment of Colby's Method. **Weed Technology**, Lawrence, v. 2, p. 304-309, 1988.

FRANKE, R.; SCHREIBER, L. Suberin: a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 10, p. 252-259, 2007.

FREDERICK, S.E. DAB procedures. In: VAUGHN, K.C. (Ed.). **CRC handbook of plant cytochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 1987. v. 1, p. 3-23.

GÄLWEILER, L.; GUAN, C.; MÜLLER, A.; WISMAN, E.; MENDGEN, K.; YEPHREMOV, A.; PALME, K. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. **Science**, Washington, v. 282, n. 5397, p. 2226-2230, 1998.

GAN, J.; GU, Y.; LI, Y.; YAN, H.; JI, X. Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase in complex with shikimic acid and an ATP analogue. **Biochemistry**, Washington, v. 45, p. 8539-8545, 2006.

GLEASON, C.; FOLEY, R.C.; SINGH, K.B. Mutant analysis in *Arabidopsis* provides insight into the molecular mode of action of the auxinic herbicide dicamba. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, p. 17245, 2011.

GOLDSMITH, M.H.M. The polar transport of auxin. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 45, p. 8539-8545, 1977.

GOULD, N.; THORPE, M.R.; KOROLEVA, O.; MINCHIN, P.E.H. Phloem hydrostatic pressure relates to solute loading rate: a direct test of the Münch hypothesis. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 32, p. 1019-1026, 2005.

GRATAO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; CARVALHO, R.F.; TEZOTTO, T.; PIOTTO, F.A.; PERES, L.E.; AZEVEDO, R.A. Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 56, p. 79-96, 2012.

GREEN, J.M. Herbicide antagonism at the whole plant level. **Weed Technology**, Lawrence, v. 3, p. 217-226, 1989.

GROSSMANN, K. Auxin herbicide action: lifting the veil step by step. **Plant Signalling and Behavior**, Georgetown, v. 2, p. 421-425, 2007.

_____. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. **Pest Management Science**, Sussex, v. 66, p. 113-120, 2010.

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

HANSEN, H.; GROSSMANN, K. Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, p. 1437-1448, 2000.

HARBORNE, J.B. Role of secondary metabolites in chemical defence mechanisms in plants. **Ciba Foundation Symposium**, London, v. 154, p. 126-134, 1990.

HATZIOS; K.K.; PENNER; D. Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. **Weed Science**, Lawrence, v. 1, p. 1-63, 1985.

HERRMANN, KM. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, p. 7-12, 1995.

HERTEL, R.; THOMSON, K.S.; RUSSO, V.E.A. In-vitro auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles. **Planta**, Berlin, v. 107 p. 325–340, 1972.

HETHERINGTON, P.R.; REYNOLDS, T.L.; MARSHALL, G.; KIRKWOOD, R.C. The absorption, translocation and distribution of the herbicide glyphosate in maize expressing the CP-4 transgene. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, p. 339, 1999.

IVANCHENKO, M.G.; ZHU, J.; WANG, B.; MEDVECKA, E.; DU, Y.; AZZARELLO, E.; MANCUSO, S.; MEGRAW, M.; FILICHKIN, S.; DUBROVSKY, J. G.; FRIML, J.; GEISLER, M. The cyclophilin A DIAGEOTROPICA gene affects auxin transport in both root and shoot to control lateral root formation. **Development**, Cambridge, v. 142, p. 712-721, 2015.

JEFFERSON, R.A.; KAVANAGH, T.A.; BEVAN, M.W. GUS fusions: B-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 6, p. 3901-3907, 1987

JENSEN, N.B.; ZAGROBELNY, M.; HJERNO, K.; OLSEN, C.E.; HOUGHTON-LARSEN, J.; BORCH, J.; MOLLER, B.L.; BAK, S. Convergent evolution in biosynthesis of cyanogenic defence compounds in plants and insects. **Nature Communications**, London, v. 2, p. 273, 2011.

JIANG, L.X.; JIN, L.G.; GUO, Y.; TAO, B.; QIU, L.J. Glyphosate effects on the gene expression of the apical bud in soybean (*Glycine max*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 437, p. 544-549, 2013.

JONES, M.A.; RAYMOND, M.J.; YANG, Z.; SMIRNOFF, N. NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 1261–1270, 2007.

KELLY, M.O.; BRADFORD, K.J. Insensitivity of the diageotropica tomato mutant to auxin. **Plant Physiology**, Rockville, v. 82, p. 713-717, 1986.

- KLEINE-VEHN, J.; DHONUKSHE, P.; SWARUP, R.; BENNETT, M.; FRIML, J. Subcellular trafficking of the *Arabidopsis* auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, n. 11, p. 3171-3181, 2006.
- KNUDSEN, J.T.; TOLLSTEN, L.; BERGSTRÖM, L.G. Floral scents: a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. **Phytochemistry**, London, v. 33 p. 253–280, 1993.
- KUMARI, S.; ROY, S.; SINGH, P.; SINGLA-PAREEK, S.L.; PAREEK, A. Cyclophilins: proteins in search of function. **Plant Signaling and Behavior**, Georgetown, v. 8, p. 227-234, 2013.
- KUYKENDALL, L.D.; SHAO, J.Y. Genes encoding callose synthase and phytochrome A are adjacent to a MAP3 kalpha-like gene in *Beta vulgaris* US H20. **International Journal Plant Genomics**, Chicago, v. 2011, p. 37054-37062, 2011.
- LANAHAN, M.B.; YEN, H.C.; GIOVANNONI, J.J.; KLEE, H.J. The never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. **The Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 521-530, 1994.
- LEE, T.T. Mode of action of glyphosate in relation to metabolism of indole-3-acetic acid. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 54 p. 289-294, 1982.
- LU, H. Dissection of salicylic acid-mediated defense signaling networks. **Plant Signaling and Behavior**, Georgetown, v. 4, p. 713–717, 2009.
- LYM, R.G. Leafy spurge (*Euphorbia esula*) control with glyphosate plus 2,4-D. **Journal of Range Management**, Denver, v. 53 p. 68-72, 2000
- MACLEAN, J.; ALI, S. The structure of chorismate synthase reveals a novel flavin binding site fundamental to a unique chemical reaction. **Structure**, Cambridge, v. 11 p. 1499-1511, 2003.
- MAEDA, H.; DUDAREVA, N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, p. 73-105, 2012.
- MAESHIMA, M. Tonoplast transporters: organization and function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 469-497, 2001.
- MARTIN, R.A.; EDGINGTONA, L.V. Comparative systemic translocation of several xenobiotics and sucrose. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 16, p. 87–96, 1981.
- MICHELET, B.; BOUTRY, M. The plasma membrane H⁺-ATPase (a highly regulated enzyme with multiple physiological functions). **Plant Physiology**, Rockville, v. 108 p. 1–6, 1995.
- MONSHAUSEN, G.B.; GILROY, S. Feeling green: mechanosensing in plants. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 19, p. 228-235, 2009.

MORSE, P.M. Some comments on the assessment of joint action in herbicide mixtures. **Weed Science**, Lawrence, v. 26, n. 1, p. 58-71, 1978.

MOUSDALE, D.M.; COGGINS, J.R. Subcellular localization of the common shikimate-pathway enzymes in *Pisum sativum* L. **Planta**, Berlin, v. 163, p. 241-249, 1985.

NALEWAJA, J.D.; MATYSIAK, R. Salt antagonism of glyphosate, **Weed Science**, Lawrence, v. 39 p. 622-628, 1991.

OH, K.; IVANCHENKO, M.G.; WHITE, T.J.; LOMAX, T.L. The diageotropica gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signaling. **Planta**, Berlin, v. 224, p. 133-144, 2006.

OPARKA, K.J.; SANTA CRUZ, S. The great escape: phloem transport and unloading of macromolecules. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 323-347, 2000.

O'SULLIVAN, P.A.; O'DONOVAN, J.T. Interaction between glyphosate and various herbicides for broadleaf weed control. **Weed Research**, Oxford, v. 20, p. 255-260, 1980.

PALLAS, J.E. Effects of temperature and humidity on foliar absorption and translocation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and benzoic acid 123. **Plant Physiology**, Rockville, v. 35, p. 575-580, 1960.

PAZMIÑO, D.M.; RODRÍGUEZ-SERRANO, M.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; ARCHILLA-RUIZ, A.; DEL RÍO, L.A.; SANDALIO, L.M. Differential response of young and adult leaves to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in pea plants: role of reactive oxygen species. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 34, p. 1874-1889, 2011.

PEREIRA C.S.; RIBEIRO, J.M.; VATULESCU, A.D.; FINDLAY, K.; MACDOUGALL, A.J.; JACKSON, P.A. Extension network formation in *Vitis vinifera* callus cells is an essential and causal event in rapid and H₂O₂-induced reduction in primary cell wall hydration. **BMC Plant Biology**, London, v. 11, p. 106, 2011.

PETRÁŠEK, J.; MRAVEC, J.; BOUCHARD, R.; BLAKESLEE, J.J.; ABAS, M.; SEIFERTOVÁ, D.; WIŚNIEWSKA, J.; TADELE, Z.; KUBEŠ, M.; ČOVANOVÁ, M.; DHONUKSHE, P.; SKŮPA, P.; BENKOVÁ, E.; PERRY, L.; KŘEČEK, P.; LEE, O.R.; FINK, G.R.; GEISLER, M.; MURPHY, A.S.; LUSCHNIG, C.; ZAŽÍMALOVÁ, E.; FRIML, J. PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. **Science**, Washington, v. 312, n. 5775, p. 914-918, 2006.

POPOV, V.N.; PURVIS, A.C.; SKULACHEV, V.P.; WAGNER, A.M. Stress-induced changes in ubiquinone concentration and alternative oxidase in plant mitochondria. **Bioscience Reports**, London, v. 21, p. 369-379, 2001.

QUIEL, J.A.; BENDER, J. Glucose conjugation of anthranilate by the *Arabidopsis* UGT74F2 glucosyltransferase is required for tryptophan mutant blue fluorescence. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, p. 6275-6281, 2003.

RAHMAN, A.; BANNIGAN, A.; SULAMAN, W.; PECHTER, P.; BLANCAFLOR, E.B.; BASKIN, T.I. Auxin, actin and growth of the *Arabidopsis thaliana* primary root. **The Plant Journal**, Oxford, v. 50, p. 514–528, 2007.

RODRIGUEZ-SERRANO, M.; PAZMINO, D.M.; SPARKES, I.; ROCHETTI, A.; HAWES, C.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; SANDALIO, L.M. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid promotes S-nitrosylation and oxidation of actin affecting cytoskeleton and peroxisomal dynamics. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n.17, p. 4783-4793, 2014.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; GÓMEZ, M.; SANDALIO, L.M.; CORPAS, F.J.; DEL RÍO, L.A.; PALMA, J.M. Reactive oxygen species-mediated enzymatic systems involved in the oxidative action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 27, p. 1135-1148, 2004.

RUBIN, J.L.; JENSEN, R.A. Differentially regulated isozymes of 3-deoxy-d-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from seedlings of *Vigna radiata* [L.] Wilczek. **Plant Physiology**, Rockville, v. 79, p. 711-718, 1985.

RUTSCHOW, H.L.; BASKIN, T.I.; KRAMER, E.M. Regulation of solute flux through plasmodesmata in the root meristem. **Plant Physiology**, Rockville, v. 155, p. 1817-1826, 2011.

SAUER M.; KLEINE-VEHN J. Auxin binding protein1: the outsider. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, p. 2033–2043, 2011

SAUER, M.; ROBERT, S.; KLEINE-VEHN, J. Auxin: simply complicated. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, p. 2565–2577, 2013.

SCHALLER, A.; VAN AFFERDEN, M.; WINDHOFER, V.; BÜLOW, S.; ABEL, G.; SCHMID, J.; AMRHEIN, N. Purification and characterization of chorismate synthase from *Euglena gracilis*.1: Comparison with chorismate synthases of plant and microbial origin. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, p. 1271-1279, 1991.

SCHÖNBRUNN, E.; ESCHENBURG, S.; SHUTTLEWORTH, W.A.; SCHLOSS, J.V.; AMRHEIN, N.; EVANS, J.N.S.; KABSCH, W. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 98, p. 1376-1380, 2001.

SCHÖNHERR, J. A mechanistic analysis of penetration of glyphosate salts across stomatous cuticular membranes. **Pest Management Science**, Sussex, v. 58 p. 343-351, 2002.

_____. Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 11, p. 2471–2491, 2006.

SHARKHUU, A.; NARASIMHAN, M.L.; MERZABAN, J.S.; BRESSAN, R.A.; WELLER, S.; GEHRING, C. A red and far-red light receptor mutation confers resistance to the herbicide glyphosate. **The Plant Journal**, Oxford, v. 78 p. 916-926, 2014.

SIMPSON, C.; THOMAS, C.; FINDLAY, K.; BAYER, E.; MAULE, A. J. An Arabidopsis GPI-anchor plasmodesmal neck protein with callose binding activity and potential to regulate cell-to-cell trafficking. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, p. 581-594, 2009.

STEINRUCKEN, H.C.; AMRHEIN, N. 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumoniae* 2. Inhibition by glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine]. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 143, p. 351-357, 1984.

STOTZ, H.U.; SAWADA, Y.; SHIMADA, Y.; HIRAI, M.Y.; SASAKI, E.; KRISCHKE, M.; BROWN, P.D.; SAITO, K.; KAMIYA, Y. Role of camalexin, indole glucosinolates, and side chain modification of glucosinolate-derived isothiocyanates in defense of Arabidopsis against *Sclerotinia sclerotiorum*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 67, p. 81-93, 2011.

SU, Y.S.; LAGARIAS, J.C. Light-independent phytochrome signaling mediated by dominant gaf domain tyrosine mutants of *Arabidopsis* phytochromes in transgenic plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 2124-2139, 2007.

TAN, X.; CALDERON-VILLALOBOS, L.I.; SHARON, M.; ZHENG, C.; ROBINSON, C.V.; ESTELLE, M.; ZHENG, N. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. **Nature**, London, v. 446, p. 640-645, 2007.

THELEN, D.K.; JACKSON, E.P.; PENNER, D. 2,4-D interactions with glyphosate and sodium bicarbonate. **Weed Technology**, Lawrence, v. 9, n. 2, p. 301-305, 1995

TOHGE, T.; WATANABE, M.; HOEFGEN, R.; FERNIE, A. R. Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, p. 12-13, 2013.

TROMAS, A.; PAPONOV, I.; PERROT-RECHENMANN, C. Auxin binding protein. 1: Functional and evolutionary aspects. **Trends in Plant Science**, London, v. 15 p. 436-446, 2010.

TYAGI, S.; BANKE, J.; CHAWDA, R.; KUMAR, A. Suppression of glyphosate toxicity in plants following peroxide treatment. **Toxicological & Environmental Chemistry**, New York, v. 94, p. 1331-1341, 2012.

TZIN, V.; GALILI, G. The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. **The Arabidopsis Book**, Danvers, v. 8, p 7-18, 2010.

VAN TUINEN, A.; HANHART, C.J.; KERCKHOFFS, L.H.J.; NAGATANI, A.; BOYLAN, M.T.; QUAIL, P.H.; KENDRICK, R.E.; KOORNNEEF, M. Analysis of phytochrome-deficient yellow-green-2 and aurea mutants of tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v. 9, p.173-182, 1996.

VANNOZZI, A.; DRY, I.B.; FASOLI, M.; ZENONI, S.; LUCCHIN, M. Genome-wide analysis of the grapevine stilbene synthase multigenic family: genomic organization and expression profiles upon biotic and abiotic stresses. **BMC Plant Biology**, London, v. 12, p. 130, 2012.

VELINI, E.D.; TRINDADE, M.L.B.; BARBERIS, L.R.M.; DUKE, S.O. Growth regulation and other secondary effects of herbicides. **Weed Science**, Lawrence, v. 58, p. 351-354, 2010.

VERDEIL, J.L.; HOCHER, V.; HUET, C.; GROSDÉMANGE, F.; ESCOUTE, J.; FERRIÈRE, N.; NICOLE, M. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. **Annals of Botany**, London, v. 88, p. 9-18, 2001.

VERDONK, J.C.; RIC DE VOS, C.H.; VERHOEVEN, H.A.; HARING, M.A.; VAN TUNEN, A.J.; SCHUURINK, R.C. Regulation of floral scent production in petunia revealed by targeted metabolomics. **Phytochemistry**, London, v. 62 p. 997-1008, 2003.

VILLALOBOS, L.; LEE, S.; DE OLIVEIRA, C.; IVETAC, A.; BRANDT, W.; ARMITAGE, L.; SHEARD, L.B.; TAN, X.; PARRY, G.; MAO, H.; ZHENG, N.; NAPIER, R.; KEPINSKI, S.; ESTELLE, M. A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. **Nature Chemical Biology**, London, v. 8, p. 477-485, 2012.

VIVANCOS, P.D.; DRISCOLL, S.P.; BULMAN, C.A.; YING, L.; EMAMI, K.; TREUMANN, A.; MAUVE, C.; NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Perturbations of amino acid metabolism associated with glyphosate-dependent inhibition of shikimic acid metabolism affect cellular redox homeostasis and alter the abundance of proteins involved in photosynthesis and photorespiration. **Plant Physiology**, Rockville, v. 157, p. 256-268, 2011.

VOGT, T. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular Plant**, Cambridge, v. 3, p. 2-20, 2010.

VOLL, L.M.; ALLAIRE, E.E.; FIENE, G.; WEBER, A.P. The *Arabidopsis* phenylalanine insensitive growth mutant exhibits a deregulated amino acid metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, p. 3058–3069, 2004.

WANG, C.J.; LIU, Z.Q. Foliar uptake of pesticides: present status and future challenge. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 87, p. 1–8, 2007.

WANG, G.; ZHANG, C.; BATTLE, S.; LU, H. The phosphate transporter PHT4;1 is a salicylic acid regulator likely controlled by the circadian clock protein CCA1. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, n. 701, p. 1-10, 2014.

WANG, S.; ZHANG, S.; SUN C.; XU Y.; CHEN, Y.; YU, C.; QIAN, Q. CHIA, JIANG, D. A.; QI, Y. Auxin response factor (OsARF12), a novel regulator for phosphate homeostasis in rice (*Oryza sativa*). **New Phytologist**, Cambridge, v. 201, p. 91-103, 2013.

WENG, J.K.; CHAPPLE, C. The origin and evolution of lignin biosynthesis. **New Phytologist**, Cambridge, v. 187, p. 273-285, 2010.

WOLF, S.; HÉMATY, H.; HERMAN, K. Growth control and cell wall signalling in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, p. 381-407, 2012.

WRIGHT, T.R.; SHAN, G.; WALSH, T.A.; LIRA, J.M.; CUI, C.; SONG, P.; ZHUANG, M.; ARNOLD, N.L.; LIN, G.; YAU, K.; RUSSELL, S.M.; CICCHILLO, R.M.; PETERSON, M.A.; SIMPSON, D.M.; ZHOU, N.; PONSAMUEL, J.; ZHANG, Z. Robust crop resistance to broadleaf and grass herbicides provided by aryloxyalkanoate dioxygenase transgenes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 107, n. 47, p. 20240–20245, 2010.

YAMAMOTO, M.; YAMAMOTO, K.T. Differential effects of 1-naphthaleneacetic acid, indole-3-acetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the gravitropic response of roots in an auxin-resistant mutant of *Arabidopsis*, auxl. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v. 39, p. 660-664, 1998.

YU, F.; QIAN, L.; NIBAU, C.; DUAN, Q.; KITA, D.; LEVASSEUR, K.; LI, X.; LU, C.; LI, H.; HOU, C. Feronia receptor kinase pathway suppresses abscisic acid signaling in *Arabidopsis* by activating ABI2 phosphatase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 109, p. 14693–14698, 2012.

ANEXOS

Tabelas suplementares

Tabela S1 - Análise da variância da translocação de glifosato radiomarcado em plantas de MT. 72 HAT^b

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Formulações glifosato (F ^a 1)	3	1.074,92	358	13,29	> 0,01
Mistura 2,4-D (F2)	2	196,26	98,1	3,64	0,04
F1 x F2	6	215,66	35,9	1,33	0,28
Resíduos	24	646,68	26,9		
Total	35	2.133,52			

^aF = Fator

^bHAT – Horas após o tratamento.

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S2 - Análise da variância da translocação de 2,4-D radiomarcado em plantas de MT; 72 HAT^b

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Mistura glifosato (F ^a 1)	4	2.011,2	502,81	12,62	> 0,01
Formulações 2,4-D (F2)	1	650,4	650	16,32	> 0,01
F1 x F2	4	92,4	23,1	0,58	0,68
Resíduos	20	797	39,9		
Total	29	3.551			

^aF = Fator

^bHAT – Horas após o tratamento.

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S3 - Análise da variância das médias de massa seca de combinação de várias doses de 2,4-D e Glifosato em plantas de Micro-Tom aos 21 DAT^a

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Doses glifosato (F ^b 1)	4	20,32	5,08	30,722	> 0,01
Doses 2,4-D (F2)	4	26,699	6,6748	40,368	> 0,01
F1 x F2	16	22,028	1,3768	8,326	> 0,01
Resíduos	125	20,669	0,1654		
Total	149	89,716			

^aDAT – Dias após o tratamento

^bF = Fator

Fonte: Piracicaba, 2014,

Tabela S4 - Análise do desdobramento das diferentes doses de glifosato aplicadas separadamente e em combinação de várias doses de 2,4-D

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
F1	4	26,69927	6,67482	40,3678	> 0,01
F1:F2 0*	4	13,14842	3,28711	19,8797	> 0,01
F1:F2 35	4	5,17305	1,29326	7,8214	> 0,01
F1:F2 70	4	14,67592	3,66898	22,1892	> 0,01
F1:F2 140	4	8,00225	2,00056	12,099	> 0,01
F1:F2 280	4	1,34849	0,33712	2,0388	0,09
Resíduos	125	20,66875	0,16535		
Total	149	89,71615	0,60212		

F = Fator

* g ia ha⁻¹

Fonte: Piracicaba, 2014,

Tabela S5 - Análise do desdobramento das diferentes doses de 2,4-D aplicadas separadamente e em combinação de várias doses de glifosato

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
F2	4	20,31983	5,07996	30,7225	> 0,01
F2:F1 0*	4	18,99131	4,74783	28,7138	> 0,01
F2:F1 35	4	11,09589	2,77397	16,7764	> 0,01
F2:F1 70	4	4,10035	1,02509	6,1995	> 0,01
F2:F1 140	4	10,25993	2,56498	15,5124	> 0,01
F2:F1 280	4	4,28008	1,07002	6,4712	> 0,01
Resíduos	125	20,66875	0,16535		
Total	149	89,71615	0,60212		

F = Fator

* g ia ha⁻¹

Fonte: Piracicaba, 2014,

Tabela S6 - Análise da variância do controle visual do efeito fitotóxico de 2,4-D, glifosato e sua mistura em plantas de Micro-Tom e mutantes aos 21 DAT^a

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Micro-Tom e mutantes					
(F ^b 1)	3	30,03	10,0101	35,556	> 0,01
Herbicidas e mistura (F2)	3	69,973	23,3242	82,849	> 0,01
F1 x F2	9	23,942	2,6602	9,449	> 0,01
Resíduos	32	9,009	0,2815		
Total	47	132,954			

^aF = Fator^bDAT – Dias após o tratamento

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S7 - Análise do desdobramento das médias de controle visual para diferentes tratamentos herbicidas dentro de plantas de Micro-Tom e mutantes

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
F2	3	69,97	23,32	82,85	> 0,01
F2:F1 Controle	3	9,79	3,26	11,59	> 0,01
F2:F1 Glifosato	3	25,91	8,63	30,68	> 0,01
F2:F1 2,4-D	3	15,15	5,05	17,94	> 0,01
F2:F1 Glifosato + 2,4-D	3	3,11	1,03	3,68	0,022
Resíduos	32	9,01	0,28		
Total	47	132,95	2,82		

^aF = Fator

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S8 - Análise do desdobramento das médias de controle visual para plantas de Micro-Tom (MT) e mutantes (*dgt* – *diageotropica*; *Nr* – Never ripe; *yg2* – *yellow-green2*) dentro de diferentes tratamentos herbicidas

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
F1	3	30,03	10,01	35,56	> 0,01
F1:F2 (<i>dgt</i>)	3	29,31	9,77	34,70	> 0,01
F1:F2 (MT)	3	28,29	9,43	33,50	> 0,01
F1:F2 (<i>Nr</i>)	3	13,60	4,53	16,10	> 0,01
F1:F2 (<i>yg2</i>)	3	22,72	7,57	26,90	> 0,01
Resíduos	32	9,01	0,28		
Total	47	132,95	2,83		

F = Fator

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S9 - Análise da variância das médias de massa seca em plantas de Micro-Tom e mutantes aplicados com 2,4-D, Glifosato e sua mistura, 21 DAT^b

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
MT e mutantes (F ^a 1)	3	8.662,6	2887,52	79,85	> 0,01
Herbicidas e mistura (F2)	2	410,1	205,04	5,67	> 0,01
F1 x F2	6	11.745,7	1957,62	54,13	> 0,01
Resíduos	60	2.169,7	36,16		
Total	71	22.988			

^aF = Fator^bDAT – Dias após o tratamento

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S10 - Análise do desdobramento da massa seca dos diferentes tratamentos herbicidas dentro de plantas de Micro-Tom e mutantes

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
F2	2	410,08	205,04	5,67	> 0,01
F2:F1 Glifosato	3	875,46	291,82	8,07	> 0,01
F2:F1 2,4-D	3	15.696,33	5.232,11	144,69	> 0,01
F2:F1 Glifosato + 2,4-D	3	3.836,46	1.278,82	35,36	> 0,01
Resíduos	60	2.169,67	36,16		
Total	71	22.988,00	323,77		

F = Fator

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S11 - Análise do desdobramento da massa seca das plantas de Micro-Tom e mutantes *dgt* – *diageotropica*; *Nr* – Never ripe; *yg2* – *yellow-green2*) dentro dos diferentes tratamentos herbicidas

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
F1	3	8.662,56	2.887,52	79,85	> 0,01
F1:F2 (<i>dgt</i>)	2	5.227,11	2.613,56	72,28	> 0,01
F1:F2 (MT)	2	2.568,78	1.284,39	35,52	> 0,01
F1:F2 (<i>Nr</i>)	2	1.132,44	566,22	15,66	> 0,01
F1:F2 (<i>yg2</i>)	2	3.227,44	1.613,72	44,63	> 0,01
Resíduos	60	2.169,67	36,16		
Total	71	22.988,00	323,77		

F = Fator

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S12 - Análise da variância das médias de ¹⁴C-Glifosato (¹⁴C-Gli) absorvido em plantas de Micro-Tom e mutantes aplicados com ¹⁴C-Gli sem mistura e misturado com 2,4-D, 21 DAT^b

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Mutantes (F ^a 1)	3	28,08	9,36	5,93	0,01
¹⁴ C-Gli(F2)	1	38,84	38,84	24,62	> 0,01
F1 x F2	3	22,43	7,48	4,74	0,01
Resíduos	16	25,24	1,58		
Total	23	114,59			

^aF = Fator^bDAT – Dias após o tratamento

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S13 - Análise do desdobramento das médias de absorção de ^{14}C -Glifosato (^{14}C -Gli) aplicado sem mistura e misturado com 2,4-D dentro de plantas de Micro-Tom e mutantes

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
F2	1	38,84	38,84	24,62	> 0,01
F2:F1 (^{14}C -Gli)	3	11,24	3,75	2,38	0,11
F2:F1 (^{14}C -Gli+ 2,4-D)	3	39,27	13,09	8,30	> 0,01
Resíduos	16	25,24	1,58		
Total	23	114,59	4,98		

F = Fator

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S14 - Análise do desdobramento das médias de absorção de ^{14}C -Glifosato (^{14}C -Gli) aplicado em Micro-Tom e mutantes (*dgt* – *diageotropica*; *Nr* – Never ripe; *yg2* – *yellow-green2*) dentro dos tratamentos herbicidas

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
F1	3	28,08	9,36	5,93	> 0,01
F1:F2 (<i>dgt</i>)	1	5,42	5,42	3,43	0,08
F1:F2 (MT)	1	8,40	8,40	5,33	0,03
F1:F2 (<i>Nr</i>)	1	0,13	0,13	0,08	0,77
F1:F2 (<i>yg2</i>)	1	47,32	47,32	30,00	> 0,01
Resíduos	16	25,24	1,58		
Total	23	114,59	4,98		

F = Fator

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S15 - Análise da variância das médias de ^{14}C -Glifosato (^{14}C -Gli) retido nos tecidos da folha aplicada de plantas de Micro-Tom e mutantes aplicados com ^{14}C -Gli sem mistura e misturado com 2,4-D, 21 DAT^b

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Mutantes (F ^a 1)	3	257,09	85,70	1,54	0,24
^{14}C -Gli(F2)	1	14,18	14,18	0,25	0,62
F1 x F2	3	614,44	204,81	3,68	0,03
Resíduos	16	891,63	55,73		
Total	23	1.777,34			

^aF = Fator

^bDAT – Dias após o tratamento

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S16 - Análise do desdobramento das médias de ^{14}C -Glifosato (^{14}C -Gli) retido nos tecidos da folha tratada, aplicado sem mistura e misturado com 2,4-D dentro de plantas de Micro-Tom e mutantes

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
F2	1	14,18	14,18	0,25	0,62
F2:F1 (^{14}C -Gli)	3	707,69	235,90	4,23	0,02
F2:F1 (^{14}C -Gli+ 2,4-D)	3	163,84	54,61	0,98	0,43
Resíduos	16	891,63	55,73		
Total	23	1.777,34	77,28		

F = Fator

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S17 - Análise do desdobramento das médias de ^{14}C -Glifosato nos tecidos da folha tratada em Micro-Tom (MT) e mutantes (*dgt* – *diageotropica*; *Nr* – *Never ripe*; *yg2* – *yellow-green2*) dentro dos tratamentos herbicidas

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
F1	3	257,09	85,70	1,54	0,24
F1:F2 (<i>dgt</i>)	1	31,69	31,69	0,57	0,46
F1:F2 (MT)	1	319,89	319,89	5,74	0,03
F1:F2 (<i>Nr</i>)	1	0,42	0,42	0,01	0,93
F1:F2 (<i>yg2</i>)	1	276,62	276,62	4,96	0,04
Resíduos	16	891,63	55,73		
Total	23	1.777,34	77,28		

F = Fator

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S18 - Análise da variância das médias de ^{14}C -2,4-D absorvido em plantas de Micro-Tom e mutantes aplicados com ^{14}C -2,4-D sem mistura e misturado com glifosato, 21 DAT^b

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Mutantes (F1)	3	741.72	247.24	10.69	> 0,01
^{14}C -2,4-D (F2)	1	333.62	333.62	14.42	> 0,01
F1 x F2	3	321.05	107.02	4.63	> 0,01
Resíduos	16	370.08	23.13		
Total	23	1.766.46			

^aF = Fator^bDAT – Dias após o tratamento

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S19 - Análise do desdobramento das médias de absorção de ^{14}C -2,4-D aplicado sem mistura e misturado com glifosato dentro de plantas de Micro-Tom e mutantes

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
F2	1	333,62	333,62	14,42	> 0,01
F2:F1 (^{14}C -2,4-D)	3	796,96	265,65	11,49	> 0,01
F2:F1 (Glifosato+ ^{14}C -2,4-D)	3	265,81	88,60	3,83	> 0,01
Resíduos	16	370,08	23,13		
Total	23	1.766,46	76,80		

F = Fator

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S20 - Análise do desdobramento das médias de absorção de ^{14}C -2,4-D aplicado em Micro-Tom e mutantes (*dgt* – *diageotropica*; *Nr* – Never ripe; *yg2* – *yellow-green2*) dentro dos tratamentos herbicidas

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
F1	3.00	741.72	247.24	1.07E+01	> 0,01
F1:F2 (<i>dgt</i>)	1.00	450.26	450.26	19.4665	> 0,01
F1:F2 (MT)	1.00	9.45	9.45	0.4085	0.53
F1:F2 (<i>Nr</i>)	1.00	163.71	163.71	7.0779	0.02
F1:F2 (<i>yg2</i>)	1.00	31.25	31.25	1.3509	0.26
Resíduos	16.00	370.08	23.13		
Total	23.00	1.766.46	76.80		

F = Fator

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S21 - Análise da variância das médias de ^{14}C -2,4-D retido nos tecidos da folha tratada em plantas de Micro-Tom e mutantes aplicados com ^{14}C -2,4-D sem mistura e misturado com glifosato, 21 DAT^b

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Mutantes (F1)	3	774,30	258,12	1,38	0,29
^{14}C -2,4-D (F2)	1	23,60	23,64	0,13	0,73
F1 x F2	3	558,70	186,24	0,99	0,42
Resíduos	16	2.998,30	187,40		
Total	23	4.355,00			

^aF = Fator^bDAT – Dias após o tratamento

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S22 - Análise da variância das médias do acúmulo de ácido chiquímico em plantas de Micro-Tom aplicadas com glifosato e 2,4-D separadamente e em mistura durante os diferentes dias de avaliação: 7, 14 e 21 DAT^b

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Dias (F1)	2	0,53	0,27	4,07	0,02
Herbicidas (F2)	2	36,66	18,33	279,47	> 0,01
F1 x F2	4	9,25	2,31	35,25	> 0,01
Resíduos	45	2,95	0,07		
Total	53	49,40			

^aF = Fator

^bDAT – Dias após o tratamento

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S23 - Análise do desdobramento das médias de acúmulo de ácido chiquímico em Micro-Tom aplicado com glifosato, 2,4-D e sua mistura dentro dos diferentes dias de avaliação

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
F ²	2	36,66	18,33	279,47	> 0,01
F2:F1 (Gli)	2	3,72	1,86	28,33	> 0,01
F2:F1 (2,4-D)	2	0,15	0,07	1,11	0,34
F2:F1 (Gli + 2,4-D)	2	5,92	2,96	45,13	> 0,01
Resíduos	45	2,95	0,07		
Total	53	49,40	0,93		

^aF = Fator

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S24 - Análise de regressão e ajustamento do modelo para avaliar o comportamento do acúmulo de ácido chiquímico no período de 7 a 21 dias após o tratamento com glifosato no Micro-Tom

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Efeito linear	1	2,47	2,47	37,71	> 0,01
Efeito quadrático	1	1,24	1,24	18,95	> 0,01
Desvios de Regressão	0	0,00	0,00	0,00	1
Resíduos	45	2,95	0,07		

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S25 - Análise de regressão e ajustamento do modelo para avaliar o comportamento do acúmulo de ácido chiquímico no período de 7 a 21 dias após o tratamento com glifosato + 2,4-D no Micro-Tom

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Efeito linear	1	5,57	5,57	84,96	> 0,01
Efeito quadrático	1	0,35	0,35	5,30	0,03
Desvios de Regressão	0	0	0	0	1
Resíduos	45	2,95	0,07		

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S26 - Análise do desdobramento das médias de acúmulo de ácido chiquímico nos diferentes dias de avaliação dentro dos tratamentos com glifosato, 2,4-D e sua mistura no Micro-Tom

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
F ^a 2	2	0,53	0,27	4,07	0,02
F1:F2 (Dia 7)	2	19,30	9,65	147,15	> 0,01
F1:F2 (Dia 14)	2	18,10	9,05	137,97	> 0,01
F1:F2 (Dia 21)	2	8,51	4,25	64,85	> 0,01
Resíduos	45	2,95	0,07		
Total	53	49,40	0,93		

^aF = Fator

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S27 - Análise da variância das médias do acúmulo de ácido chiquímico em plantas de *diageotropica* aplicadas com glifosato e 2,4-D separadamente e em mistura durante os diferentes dias de avaliação: 7, 14 e 21 DAT^b

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Dias (F ^a 1)	2	2,40	1,20	24,67	> 0,01
Herbicidas (F2)	2	17,44	8,72	179,08	> 0,01
F1 x F2	4	1,04	0,26	5,34	> 0,01
Resíduos	45	2,19	0,05		
Total	53	23,07			

^aF = Fator

^bDAT – Dias após o tratamento

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S28 - Análise do desdobramento das médias de acúmulo de ácido chiquímico em *diageotropica* aplicado com glifosato, 2,4-D e sua mistura dentro dos diferentes dias de avaliação

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
F ²	2	17,44	8,72	179,08	> 0,01
F2:F1 (Glifosato)	2	1,01	0,51	10,38	> 0,01
F2:F1 (2,4-D)	2	0,16	0,08	1,69	0,20
F2:F1 (Glifosato + 2,4-D)	2	2,27	1,13	23,27	> 0,01
Resíduos	45	2,19	0,05		
Total	53	23,07	0,44		

^aF = Fator

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S29 - Análise de regressão e ajustamento do modelo para avaliar o comportamento do acúmulo de ácido chiquímico no período de 7 a 21 dias após o tratamento com glifosato no mutante *diageotropica*

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Efeito linear	1	0,05	0,05	1,04	0,31
Efeito quadrático	1	0,96	0,96	19,73	> 0,01
Desvios de Regressão	0	0	0	0	1
Resíduos	45	2,19	0,05		

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S30 - Análise de regressão e ajustamento do modelo para avaliar o comportamento do acúmulo de ácido chiquímico no período de 7 a 21 dias após o tratamento com glifosato + 2,4-D no mutante *diageotropica*

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Efeito linear	1	0,04	0,04	0,83	0,37
Efeito quadrático	1	2,23	2,23	45,72	> 0,01
Desvios de Regressão	0	0	0	0	1
Resíduos	45	2,19	0,05		

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S31 - Análise do desdobramento das médias de acúmulo de ácido chiquímico nos diferentes dias de avaliação dentro dos tratamentos com glifosato, 2,4-D e sua mistura no mutante *diageotropica*

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
F ^a 2	2	2,40	1,20	24,67	> 0,01
F1:F2 (Dia 7)	2	6,11	3,06	62,77	> 0,01
F1:F2 (Dia 14)	2	8,63	4,32	88,63	> 0,01
F1:F2 (Dia 21)	2	3,74	1,87	38,36	> 0,01
Resíduos	45	2,19	0,05		
Total	53	23,07	0,44		

^aF = Fator

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S32 - Análise da variância das médias do acúmulo de ácido chiquímico em plantas de *Never ripe* aplicadas com glifosato e 2,4-D separadamente e em mistura durante os diferentes dias de avaliação: 7, 14 e 21 DAT^b

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Dias (F1)	2	2,27	1,14	34,84	> 0,01
Herbicidas (F2)	2	17,76	8,88	272,48	> 0,01
F1 x F2	4	2,42	0,60	18,56	> 0,01
Resíduos	45	1,47	0,03		
Total	53	23,91			

^aF = Fator

^bDAT – Dias após o tratamento

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S33 - Análise do desdobramento das médias de acúmulo de ácido chiquímico em *Never ripe* aplicado com glifosato, 2,4-D e sua mistura dentro dos diferentes dias de avaliação

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
F ^a 2	2	17,76	8,88	272,48	> 0,01
F2:F1 (Glifosato)	2	2,02	1,01	31,04	> 0,01
F2:F1 (2,4-D)	2	0,96	0,48	14,72	> 0,01
F2:F1 (Glifosato + 2,4-D)	2	1,71	0,85	26,20	> 0,01
Resíduos	45	1,47	0,03		
Total	53	23,91	0,45		

^aF = Fator

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S34 - Análise de regressão e ajustamento do modelo para avaliar o comportamento do acúmulo de ácido chiquímico no período de 7 a 21 dias após o tratamento com glifosato no mutante *Never ripe*

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Efeito linear	1	0,80	0,80	24,68	> 0,01
Efeito quadrático	1	1,22	1,22	37,40	> 0,01
Desvios de Regressão	0	0	0	0	1
Resíduos	45	1,47	0,03		

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S35 - Análise de regressão e ajustamento do modelo para avaliar o comportamento do acúmulo de ácido chiquímico no período de 7 a 21 dias após o tratamento com 2,4-D no mutante *Never ripe*

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Efeito linear	1	0,91	0,91	27,80	> 0,01
Efeito quadrático	1	0,05	0,05	1,63	0,21
Desvios de Regressão	0	0	0	0	1
Resíduos	45	1,47	0,03		

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S36 - Análise de regressão e ajustamento do modelo para avaliar o comportamento do acúmulo de ácido chiquímico no período de 7 a 21 dias após o tratamento com glifosato + 2,4-D no mutante *Never ripe*

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Efeito linear	1	0,12	0,12	3,80	0,06
Efeito quadrático	1	1,58	1,58	48,61	> 0,01
Desvios de Regressão	0	0	0	0	1
Resíduos	45	1,47	0,03		

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S37 - Análise do desdobramento das médias de acúmulo de ácido chiquímico nos diferentes dias de avaliação dentro dos tratamentos com Glifosato, 2,4-D e sua mistura no mutante *Never ripe*

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
F ²	2	2,27	1,14	34,84	> 0,01
F1:F2 (Dia 7)	2	9,51	4,75	145,93	> 0,01
F1:F2 (Dia 14)	2	9,26	4,63	142,10	> 0,01
F1:F2 (Dia 21)	2	1,41	0,70	21,57	> 0,01
Resíduos	45	1,47	0,03		
Total	53	23,91	0,45		

^aF = Fator

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S38 - Análise da variância das médias do acúmulo de ácido chiquímico em plantas de *yellow-green2* aplicadas com Glifosato e 2,4-D separadamente e em mistura durante os diferentes dias de avaliação: 7, 14 e 21 DAT^b

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Dias (F ^a 1)	2	4,97	2,48	122,30	> 0,01
Herbicidas (F2)	2	7,04	3,52	173,35	> 0,01
F1 x F2	4	3,03	0,76	37,27	> 0,01
Resíduos	45	0,91	0,02		
Total	53	15,95			

^aF = Fator

^bDAT – Dias após o tratamento

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S39 - Análise do desdobramento das médias de acúmulo de ácido chiquímico em *yellow-green2* aplicado com glifosato, 2,4-D e sua mistura dentro dos diferentes dias de avaliação

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
F ^a 2	2	7,042	3,521	173,352	> 0,01
F2:F1 (Glifosato)	2	2,534	1,267	62,371	> 0,01
F2:F1 (2,4-D)	2	4,471	2,235	110,060	> 0,01
F2:F1 (Glifosato + 2,4-D)	2	0,991	0,496	24,405	> 0,01
Resíduos	45	0,914	0,020		
Total	53	15,952	0,301		

^aF = Fator

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S40 - Análise de regressão e ajustamento do modelo para avaliar o comportamento do acúmulo de ácido chiquímico no período de 7 a 21 dias após o tratamento com glifosato no mutante *yellow-green2*

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Efeito linear	1	1,72	1,72	84,71	> 0,01
Efeito quadrático	1	0,81	0,81	40,03	> 0,01
Desvios de Regressão	0	0	0	0	1
Resíduos	45	0,91	0,02		

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S41 - Análise de regressão e ajustamento do modelo para avaliar o comportamento do acúmulo de ácido chiquímico no período de 7 a 21 dias após o tratamento com 2,4-D no mutante *yellow-green2*

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Efeito linear	1	0,45	0,45	22,20	> 0,01
Efeito quadrático	1	4,02	4,02	197,92	> 0,01
Desvios de Regressão	0	0	0	0	1
Resíduos	45	0,91	0,02		

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S42 - Análise de regressão e ajustamento do modelo para avaliar o comportamento do acúmulo de ácido chiquímico no período de 7 a 21 dias após o tratamento com glifosato + 2,4-D no mutante *yellow-green2*

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
Efeito linear	1	0,48	0,48	23,49	> 0,01
Efeito quadrático	1	0,51	0,51	25,32	> 0,01
Desvios de Regressão	0	0	0	0	1
Resíduos	45	0,91	0,02		

Fonte: Piracicaba, 2014.

Tabela S43 - Análise do desdobramento das médias de acúmulo de ácido chiquímico nos diferentes dias de avaliação dentro dos tratamentos com glifosato, 2,4-D e sua mistura no mutante *yellow-green2*

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-P
F ²	2	4,97	2,48	122,30	> 0,01
F1:F2 (Dia 7)	2	4,85	2,43	119,40	> 0,01
F1:F2 (Dia 14)	2	4,66	2,33	114,80	> 0,01
F1:F2 (Dia 21)	2	0,56	0,28	13,69	> 0,01
Resíduos	45	0,91	0,02		
Total	53	15,95	0,30		

^aF = Fator

Fonte: Piracicaba, 2014.