

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

Eficácia, absorção e translocação de glifosato e 2,4-D em
Spermacoce verticillata (L.)

Guilherme Barbosa Minozzi

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração em Fitotecnia

Piracicaba
2022

Guilherme Barbosa Minozzi
Engenheiro Agrônomo

Eficácia, absorção e translocação de glifosato e 2,4-D em *Spermacoce verticillata* (L.)
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração em Fitotecnia

Piracicaba
2022

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

Minozzi, Guilherme Barbosa

Eficácia, absorção e translocação de glifosato e 2,4-D em *Spermacoce verticillata* (L.) / Guilherme Barbosa Minozzi. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - -Piracicaba, 2022.

80 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Vassourinha-de-botão 2. Ácido chiquímico 3. Mimetizador de auxina
4. Tolerância herbicidas I. Título

DEDICATÓRIA

O trabalho em time ao lado de pessoas comprometidas torna todo objetivo alcançável e qualquer desafio superável.

Sempre existem pessoas nos ajudando durante nossa trajetória de vida, mesmo em alguns momentos onde não conseguimos enxergar, elas estão lá.

Assim, dedico o presente trabalho à toda minha família, minha mãe Solange Barbosa Minozzi, meu pai Luiz Antônio Minozzi, minha irmã Mariana Barbosa Minozzi e a minha esposa Suélen Cristina Duarte Minozzi.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos que sempre apoiaram e trabalharam comigo ao longo desses anos, Paulo Vinicius da Silva, Marcelo Malardo e Fabrícia dos Reis.

Gostaria de ressaltar a importância dos professores envolvidos no projeto, como o professor Pedro Jacob Christoffoleti, que me incentivou a alcançar esse objetivo, bem como os grandes professores e coorientadora Patricia Andrea Monquero, Valdemar Luis Tornisielo e Simone Possedente de Lira, grandes profissionais e pessoas que buscam construir melhores profissionais dia a dia.

Aos técnicos Rodrigo Floriano Pimpinato, do laboratório de Ecotoxicologia - CENA e Felipe Gabriel Andrino, do Laboratório de Química Orgânica de Produtos Naturais – USP/ESALQ.

Agradeço também aos agricultores que sempre abriram as portas de suas propriedades para testarmos diferentes manejos em busca de soluções eficazes, contribuindo para a produção de alimentos para o mundo.

Pelo suporte oferecido agradeço a empresa Corteva Agriscience por disponibilizar os equipamentos para algumas etapas da metodologia do projeto.

Serei sempre grato a todos vocês e desejo que os resultados descobertos por nós possam auxiliar a agricultura brasileira em nossa missão.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1. Coleta das sementes e obtenção de plantas.....	15
2.2. Locais de realização do experimento.....	16
2.3. Absorção foliar e translocação de glifosato e 2,4-D radiomarcados em <i>S. verticillata</i>	17
2.4. Resposta da planta daninha <i>S. verticillata</i> a diferentes doses de glifosato e 2,4-D.....	23
2.5. Determinação do acúmulo de ácido chiquímico após aplicação de glifosato, 2,4-D e da associação entre os dois herbicidas sobre plantas de <i>S. verticillata</i>	26
2.6. Análise estatística.....	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.1. Absorção foliar e translocação de glifosato radiomarcado em <i>S. verticillata</i>	31
3.2. Absorção foliar e translocação de 2,4-D radiomarcado em <i>S. verticillata</i>	41
3.3. Resposta da planta daninha <i>S. verticillata</i> a diferentes doses de glifosato e 2,4-D isoladas e associadas.....	49
3.4. Determinação do acúmulo de ácido chiquímico após aplicação de glifosato, 2,4-D e da associação entre os dois herbicidas sobre plantas de <i>S. verticillata</i>	67
4. CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	77

RESUMO

Eficácia, absorção e translocação de glifosato e 2,4-D em *Spermacoce verticillata* (L.)

No cerrado brasileiro as associações entre glifosato e 2,4-D são comuns. Neste contexto, a planta daninha *Spermacoce verticillata* (L.) (vassourinha-de-botão) apresenta tolerância ao herbicida 2,4-D e suscetibilidade ao glifosato (sendo essa condicionada ao estágio fenológico da planta daninha). O objetivo deste trabalho foi, determinar e quantificar a absorção e translocação de ¹⁴C glifosato e ¹⁴C 2,4-D na associação de diferentes doses dos dois herbicidas sobre plantas de *S. verticillata*, verificar a eficácia de controle de diferentes doses dos herbicidas glifosato e 2,4-D e o acúmulo de ácido chiquímico nos tecidos da parte aérea das plantas nos tratamentos de glifosato e 2,4-D isolados e associados. Para tal, foram realizados 4 experimentos em casa de vegetação e laboratório. Os dois primeiros experimentos com moléculas radiomarcadas utilizando dois fatores herbicidas ¹⁴C glifosato (0; 720 e 1440 g e.a ha⁻¹) e ¹⁴C 2,4-D (0; 167,5; 335 e 670 g e.a ha⁻¹) sendo apenas glifosato ou 2,4-D radiomarcado adotado em cada experimento, ambos no esquema fatorial 2 x 4 e 3 x 3 respectivamente, a análise das plantas foi efetuada às 72 horas após aplicação (HAA). Para o experimento de eficácia de controle, foi utilizado o esquema fatorial 6 x 6 sendo os fatores glifosato (0; 180; 360; 720; 1440 e 2880 g e.a ha⁻¹) e 2,4-D (0; 83,75; 167,5; 335; 670 e 1340 g e.a ha⁻¹) isolados e associados avaliados aos 7, 14 e 21 dias após aplicação (DAA). Para o experimento de quantificação do acúmulo de ácido chiquímico os fatores glifosato (0; 720 g e.a ha⁻¹) e 2,4-D (0; 670 g e.a ha⁻¹) foram aplicados isolados e associados em esquema fatorial 2 x 2. Em todos os ensaios o delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados, as unidades experimentais contaram com plantas com 2-3 pares de ramos laterais. Os dados foram submetidos a análise de variância a 95% de significância e quando significativos o teste de Tukey ou Scott-Knott foi adotado. A absorção e translocação de ¹⁴C glifosato na dose de 720 g e.a ha⁻¹ foi reduzida quando associada as doses do 2,4-D, enquanto para o glifosato na dose de 1440 g e.a ha⁻¹ não foram detectadas diferenças estatísticas. A absorção e translocação do ¹⁴C 2,4-D aumentaram significativamente na presença do glifosato. A eficácia de controle aos 21 DAA demonstra que o glifosato entre 720 e 2880 g e.a ha⁻¹ foi efetivo (>90%), porém o 2,4-D não (65%), a dose de 720 g e.a ha⁻¹ apresentou redução significativa de controle quando associada ao 2,4-D, enquanto as doses de 1440 e 2880 g e.a ha⁻¹ não foram influenciadas. A concentração de ácido chiquímico no tratamento de glifosato a 720 g e.a ha⁻¹ associado ao 2,4-D a 670 g e.a ha⁻¹ foi de 9.1 µg, enquanto no tratamento de glifosato isolado de 40.1 µg. Portanto, dependendo das doses utilizadas na associação verificou-se impacto na absorção e translocação dos herbicidas glifosato e 2,4-D, que pode refletir em diminuição na concentração de ácido chiquímico e controle de *S. verticillata*, tornando o controle dependente da dose associada.

Palavras-chave: Vassourinha-de-botão, Ácido chiquímico, Mimetizador de auxina, Tolerância herbicidas

ABSTRACT

**Efficacy, absorption and translocation of glyphosate and 2,4-D in
Spermacoce verticillata (L.)**

In Brazilian cerrado associations between glyphosate and 2,4-D are often performed. On this context the weed *Spermacoce verticillata* (L.) (shrubby false button weed) presents tolerance to the herbicide 2,4-D and susceptibility to glyphosate (being conditioned to the development stage of the weed). The objectives of the present work were, determine and quantify the absorption and translocation of ¹⁴C glyphosate and ¹⁴C 2,4-D in the association of different doses from both herbicides on *S. verticillata* plants, verify the efficacy of control of different doses from herbicides glyphosate and 2,4-D and the shikimic acid accumulation in plant tissues from aerial part of *S. verticillata* plants on treatments of glyphosate and 2,4-D isolated or associated. A total of four experiments were held on green house and laboratory. The first two experiments with radiolabeled molecules were conducted using the herbicide factors ¹⁴C glyphosate (0; 720 and 1440 g a.e ha⁻¹) and ¹⁴C 2,4-D (0; 167,5; 335 and 670 g a.e ha⁻¹) being only glyphosate or 2,4-D radiolabeled adopted in each experiment, both in factorial scheme 2 x 4 and 3 x 3 respectively, the plant analysis performed at 72 hours after application (HAA). For the efficacy of control trial, the factorial scheme 6 x 6 was used being the factors glyphosate (0; 180; 360; 720; 1440 and 2880 g a.e ha⁻¹) and 2,4-D (0; 83,75; 167,5; 335; 670 and 1340 g a.e ha⁻¹) alone and associated evaluated at 7, 14 and 21 days after application (DAA). For the shikimic acid accumulation experiment the factors glyphosate (0; 720 g a.e ha⁻¹) and 2,4-D (0; 670 g a.e ha⁻¹) were applied alone and associated in factorial scheme 2 x 2. In all experiments the randomized complete block design was adopted and the experimental units composed by plants with 2 – 3 side branches. The data were submitted to analysis of variance at 95% significance level and when significant Tukey or Scott-Knott test was adopted. The absorption and translocation of ¹⁴C glyphosate at 720 g a.e ha⁻¹ were reduced when associated with 2,4-D, while for glyphosate at 1440 g a.e ha⁻¹ no differences were observed. The absorption and translocation of ¹⁴C 2,4-D enhanced significantly when glyphosate was associated. The efficacy of control at 21 DAA resulted in efficient control (>90%) for glyphosate from 720 to 2880 g a.e ha⁻¹, however for 2,4-D was not efficient (65%), the glyphosate dose of 720 g a.e ha⁻¹ presented significant efficacy reduction when associated to 2,4-D, while doses of 1440 and 2880 g a.e ha⁻¹ were not influenced. The shikimic acid concentration within glyphosate treatment at 720 g a.e ha⁻¹ when associated to 2,4-D at 670 g a.e ha⁻¹ was 9.1 µg, while in treatment of glyphosate alone was 40.1 µg. According to adopted doses at the association impact was confirmed in absorption and translocation of herbicides glyphosate and 2,4-D, which might reflect in reduction in shikimic acid concentration and *S. verticillata* control, making control dependent of the associated dose.

Keywords: Shrubby false buttonweed, Shikimic acid, Auxinic herbicide, Herbicide tolerance

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Plantas cultivadas de <i>S. verticillata</i> em dois estádios de desenvolvimento, plantas no estádio vegetativo (a) e planta perenizada em pleno florescimento (b) 120 dias após a emergência em casa de vegetação no município de Mogi Mirim/SP. Fonte: Arquivo pessoal.	16
Figura 2. Proteção sobre o par de folhas opostas de <i>S. verticillata</i> com superfície plástica antes da aplicação dos herbicidas comerciais sobre a planta.....	19
Figura 3. Aplicação da solução radiomarcada nos dois pares de folhas opostas do terceiro nó da haste principal de <i>S. verticillata</i> . Detalhe para as 10 gotas de 1 µL aplicadas em cada uma das folhas (a) e equipamento utilizado no processo (b).....	19
Figura 4. Lavagem do par de folhas opostas às 72 horas após aplicação da solução herbicida radiomarcada (a, b), seguido pela remoção das plantas do substrato e lavagem das raízes (c) e elaboração da excisada com uma repetição de cada tratamento (d).	21
Figura 5. Autorradiografia de uma repetição de um dos tratamentos (a), ao lado da fotografia de sua respectiva excisada (b). As partes mais escuras da figura (a) indicam a maior presença do herbicida radiomarcado.	21
Figura 6. Equipamento de espectrometria de cintilação líquida modelo Tri-Carb 2910 TR (a) e oxidador biológico OX500 (b).....	22
Figura 7. Plantas de <i>S. verticillata</i> separadas em bancadas para a aplicação dos herbicidas (a) e plantas de uma repetição dentro da câmara de aplicação Generation III Research Sprayer – Devries Manufacturing (b).....	24
Figura 8. Plantas de <i>S. verticillata</i> em câmara de crescimento Conviron GR192 após aplicação dos herbicidas. .	25
Figura 9. Aspecto geral das plantas de <i>S. verticillata</i> no momento da aplicação dos tratamentos herbicidas (a) e plantas logo após a aplicação em câmara de aplicação (b).	27
Figura 10. Cromatografia da concentração de 1000 µg mL ⁻¹ de ácido chiquímico padrão analítico (Sigma-Aldrich 99%), destaque para a área do pico de ácido chiquímico no tempo de retenção de 3.067 minutos.	28
Figura 11. Curva de calibração do ácido chiquímico sobre os dados da área do pico de cada concentração conhecida obtidos através da construção da curva de calibração contendo 8 concentrações de padrão analítico de ácido chiquímico (99% Sigma-Aldrich).	28
Figura 12. Fotos dos processos envolvidos durante a extração do ácido chiquímico de cada amostra, a partir da inserção da parte aérea das plantas liofilizadas e trituradas em tubos com adição de solução acidificada (a), passando pela agitação (b), banho de ultrassom (c), separação do sobrenadante após centrifugação (d), filtragem (e) e inserção nos vials para leitura em HPLC (f).	29
Figura 13. Percentual total de 14 C glifosato absorvido às 72 horas após aplicação dos tratamentos contendo glifosato radiomarcado sobre as plantas de <i>S. verticillata</i> . Os números abaixo de cada boxplot indicam a média e o valor acima o número de repetições.....	33
Figura 14. Percentual total translocado às 72 horas após aplicação dos tratamentos contendo glifosato radiomarcado sobre as plantas de <i>S. verticillata</i> . Os números abaixo de cada boxplot indicam a média e o valor acima o número de repetições.....	37
Figura 15. Autorradiografias e respectivas fotos de uma repetição de cada tratamento às 72 horas após aplicação dos tratamentos contendo 14 C glifosato. Os gráficos a direita de cada figura contém o percentual da radioatividade presente nas diferentes partes da planta, em relação ao total absorvido em cada tratamento. (FT – folhas tratadas; FAC – folhas acima das tratadas; FAB – folhas abaixo das tratadas).	40
Figura 16. Percentual total absorvido às 72 horas após aplicação dos tratamentos contendo 14 C 2,4-D sobre as plantas de <i>S. verticillata</i> . Os números abaixo de cada boxplot indicam a média e o valor acima o número de repetições.	43
Figura 17. Percentual total translocado às 72 horas após aplicação dos tratamentos contendo 2,4-D radiomarcado sobre as plantas de <i>S. verticillata</i> . Os números abaixo de cada boxplot indicam a média e o valor acima o número de repetições.	44

- Figura 18. Autoradiografias e respectivas fotos de uma repetição de cada tratamento às 72 horas após aplicação dos produtos radiomarcados no experimento 2. Os gráficos a direita de cada figura contém o percentual da radioatividade presente nas diferentes partes da planta, em relação ao total absorvido em cada tratamento. (FT – folhas tratadas; FAC – folhas acima das tratadas; FAB – folhas abaixo das tratadas). 48
- Figura 19. Foto de uma repetição de cada um dos 6 níveis dos fatores glifosato e 2,4-D aos 7 DAA, as linhas representam as doses crescentes de glifosato em g e.a ha-1 (níveis do fator glifosato) e as colunas as doses crescentes de 2,4-D em g e.a ha-1 (níveis do fator 2,4-D) sobre plantas de *Spermacoce verticillata* (vassourinha-de-botão)..... 52
- Figura 20. Plantas de *Spermacoce verticillata*, contendo as quatro repetições das 36 interações entre os níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em câmara de crescimento aos 7 DAA, doses de glifosato e 2,4-D expressas em g e.a ha-1. 53
- Figura 21. Foto de uma repetição de cada um dos 6 níveis dos fatores glifosato e 2,4-D aos 14 DAA, as linhas representam as doses crescentes de glifosato em g e.a ha-1 (níveis do fator glifosato) e as colunas as doses crescentes de 2,4-D em g e.a ha-1 (níveis do fator 2,4-D) sobre plantas de *Spermacoce verticillata* (vassourinha-de-botão)..... 56
- Figura 22. Plantas de *Spermacoce verticillata*, contendo as quatro repetições das 36 interações entre os níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em câmara de crescimento aos 14 DAA, doses de glifosato e 2,4-D expressas em g e.a ha-1. 57
- Figura 23. Foto de uma repetição de cada um dos 6 níveis dos fatores glifosato e 2,4-D aos 21 DAA, as linhas representam as doses crescentes de glifosato em g e.a ha-1 (níveis do fator glifosato) e as colunas as doses crescentes de 2,4-D em g e.a ha-1 (níveis do fator 2,4-D) sobre plantas de *Spermacoce verticillata* (vassourinha-de-botão)..... 60
- Figura 24. Plantas de *Spermacoce verticillata*, contendo as quatro repetições das 36 interações entre os níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em câmara de crescimento aos 21 DAA, doses de glifosato e 2,4-D expressas em g e.a ha-1. 61
- Figura 25. Boxplot da concentração média de ácido chiquímico nos tecidos da parte aérea das plantas de *S. verticillata* aos 3 dias após aplicação de diferentes tratamentos contendo doses de glifosato e 2,4-D. Os números abaixo de cada boxplot indicam a média e o valor acima o número de repetições..... 67
- Figura 26. Boxplot da concentração média de ácido chiquímico nos tecidos da parte aérea das plantas de *S. verticillata* aos 7 dias após aplicação de diferentes tratamentos contendo doses de glifosato e 2,4-D. Os números abaixo de cada boxplot indicam a média e o valor acima o número de repetições..... 69
- Figura 27. Boxplot da concentração média de ácido chiquímico nos tecidos da parte aérea das plantas de *S. verticillata* aos 14 dias após aplicação de diferentes tratamentos contendo doses de glifosato e 2,4-D. Os números abaixo de cada boxplot indicam a média e o valor acima o número de repetições. 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição e características químicas do substrato Plantmax utilizado nos vasos para desenvolvimento das plantas de <i>S. verticillata</i>	15
Tabela 2. Tratamentos herbicidas radiomarcados com glifosato e doses dos fatores glifosato e 2,4-D aplicadas sobre as plantas de <i>S. verticillata</i> no experimento 1.	17
Tabela 3. Tratamentos herbicidas radiomarcados com 2,4-D e doses dos fatores glifosato e 2,4-D aplicadas sobre as plantas de <i>S. verticillata</i> no experimento 2	18
Tabela 4. Tratamentos herbicidas aplicados sobre as plantas de <i>S. verticillata</i> para determinação do acúmulo de ácido chiquímico nos tecidos da parte aérea (folhas + ramos) aos 3, 7 e 14 dias após aplicação.	26
Tabela 5. Balanço de massa proporcionado pelos diferentes tratamentos herbicidas. Valores indicam o percentual médio total de 14 C glifosato não absorvido, absorvido e translocado pelas plantas de <i>S. verticillata</i> às 72 horas após aplicação dos tratamentos.	31
Tabela 6. Percentual médio de glifosato não absorvido às 72 horas após aplicação dos tratamentos.	32
Tabela 7. Percentual médio de glifosato absorvido às 72 horas após aplicação dos tratamentos.	33
Tabela 8. Percentual médio de glifosato translocado às 72 horas após aplicação dos tratamentos.	35
Tabela 9. Percentual médio da radioatividade total aplicada sobre as plantas de <i>S. verticillata</i> distribuída entre as partes das plantas após oxidação no Experimento 1.	38
Tabela 10. Balanço de massa proporcionado pelos diferentes tratamentos herbicidas. Valores indicam o percentual médio de 14 C 2,4-D não absorvido, absorvido e translocado pelas plantas de <i>S. verticillata</i> às 72 horas após aplicação dos tratamentos.	41
Tabela 11. Percentual médio de 2,4-D não absorvido às 72 horas após aplicação dos tratamentos em função do fator glifosato.	42
Tabela 12. Percentual médio de 2,4-D absorvido às 72 horas após aplicação dos tratamentos em função do fator glifosato.	43
Tabela 13. Percentual médio de 2,4-D translocado às 72 horas após aplicação dos tratamentos.	44
Tabela 14. Percentual médio da radioatividade total aplicada sobre as plantas de <i>S. verticillata</i> distribuída entre as partes das plantas após oxidação no Experimento 2.	46
Tabela 15. Desdobramento dos níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em relação a porcentagem visual de controle de <i>S. verticillata</i> aos 7 DAA.	50
Tabela 16. Desdobramento dos níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em relação a porcentagem visual de controle de <i>S. verticillata</i> aos 14 DAA.	54
Tabela 17. Desdobramento dos níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em relação a porcentagem visual de controle de <i>S. verticillata</i> aos 21 DAA.	58
Tabela 18. Desdobramento dos níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em relação a média da matéria seca (g) da parte aérea de <i>S. verticillata</i> aos 21 DAA.	62
Tabela 19. Desdobramento dos níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em relação a média da matéria seca (g) das raízes de <i>S. verticillata</i> aos 21 DAA.	63
Tabela 20. Desdobramento dos níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em relação a concentração média de ácido chiquímico (μg) na parte aérea das plantas de <i>S. verticillata</i> aos 3 DAA.	68
Tabela 21. Desdobramento dos níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em relação a concentração média de ácido chiquímico (μg) na parte aérea das plantas de <i>S. verticillata</i> aos 7 DAA.	69
Tabela 22. Desdobramento dos níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em relação a concentração média de ácido chiquímico (μg) na parte aérea das plantas de <i>S. verticillata</i> aos 14 DAA.	71

1. INTRODUÇÃO

O Gênero *Spermacoce* (família Rubiaceae: Tribo Spermacoceae) é constituído por aproximadamente 250 a 300 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (Groeninckx et al. 2009). Dentro da Tribo Spermacoceae, cuja composição contempla 18 gêneros circunscritos, os gêneros *Spermacoce* L. e *Borreria* GFW Mey são os mais representativos, no Brasil 12 dentre os 18 gêneros estão presentes. De acordo com a morfologia de seus frutos estes são considerados distintos por muitos autores, entretanto, a maioria dos outros optam por combinar os dois táxons sob o nome genérico de *Spermacoce* (Nepomuceno et al. 2018).

Dentro do gênero *Spermacoce*, a *Spermacoce verticillata* (*S. verticillata*), planta daninha conhecida popularmente no Brasil como vassourinha-de-botão, tem sido relatada como infestante em lavouras de grandes culturas como soja, milho e algodão. Existem inúmeros nomes científicos sinônimos para essa planta ao redor do mundo, sendo *Borreria verticillata* um dos mais conhecidos (The Plant List 2021). O principal uso dessa espécie está na medicina tradicional, onde 29 compostos foram isolados até o presente (Izuogu et al. 2020).

No Brasil existe uma alta frequência de infestação de *S. verticillata*, especialmente na fronteira agrícola conhecida como MATOPIBA, zona contínua com predomínio do bioma cerrado representada pelos estados do Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia (Araújo et al. 2019), no entanto nos últimos anos outras regiões começaram a reportar aumento da frequência de infestação de *S. verticillata* em áreas de plantio destinados a grandes culturas, a exemplo dos estados do Mato Grosso e Goiás (Santos et al. 2018), demonstrando aumento da disseminação dessa espécie, que anteriormente estava mais restrita a região do MATOPIBA (BFG 2015).

As características e hábito de desenvolvimento de *S. verticillata* consistem em desenvolvimento inicial lento, o período entre a germinação e o estágio fenológico de dois pares de folhas totalmente expandidas é de 20 a 25 dias. As sementes germinam preferencialmente sobre o nível do solo, sendo o aumento de profundidade capaz de reduzir a emergência significativamente, promovendo 0% de emergência à 10 cm, trata-se de semente fotoblástica neutra por apresentar germinação na presença ou ausência de luz e os maiores níveis de germinação obtidos com temperaturas alternadas entre 20 e 30°C (Castilho et al. 2021).

As plantas são de habitat terrestre, apresentam estrutura de subarborescentes, podendo apresentar altura entre 30 a 100 cm, com flores com lobos do cálice linear-espatulados, cápsulas de até 2,5 mm comprimento e glabras. Exibe de 1 a 3 glomérulos por ramos e folhas pseudoverticiladas (Nepomuceno et al. 2018).

A fase reprodutiva tem início aproximadamente dois meses após a semeadura e aos 102 dias há presença de glomérulos maduros, uma característica importante é que a planta continua desenvolvendo glomérulos com flores simultaneamente a glomérulos maduros (Martins et al. 2009). A reprodução se dá exclusivamente por sementes e a planta tem capacidade de perenizar, suportando os meses mais secos do ano, podendo rebrotar no momento em que há o retorno das precipitações (Fontes e Tonato 2016).

Normalmente na região MATOPIBA, área de maior ocorrência de *S. verticillata*, podem haver infestações com plantas em diferentes estádios de desenvolvimento em uma mesma área, representadas por aquelas perenizadas rebrotadas e novos fluxos de plântulas provenientes de sementes, que germinam a partir das primeiras chuvas, com início no mês de setembro e intensificação dos fluxos de germinação nos meses de outubro a dezembro, de acordo com as subregiões homogêneas apresentada por (dos Reis et al. 2020), meses que marcam o início do plantio da nova safra, representado principalmente pela soja.

Essa dinâmica faz com que as plantas daninhas e a cultura da soja germinem em épocas próximas, adicionalmente observações de campo no estado do Mato Grosso, sugerem que novos fluxos de germinação e emergência ocorram também em estádios avançados de desenvolvimento da soja, como no estágio reprodutivo, hipótese que pode ser suportada pelo maior volume pluviométrico e frequência de distribuição ao longo do tempo nesta região (Zhang et al. 2021), bem como pela não necessidade de luz para o processo de germinação e emergência das sementes dessa espécie.

Dessa forma, manejar eficientemente infestações de *S. verticillata* pode ser complexo devido aos diferentes estádios de desenvolvimento e interações com o ambiente, sugerindo a adoção de diferentes métodos de manejo integrado, desde o cultural baseado em diferentes espécies forrageiras, produção de matéria seca sobre o solo e efeito alelopático sobre a germinação e emergência das plantas (Castilho et al. 2021, Martins e Christoffoleti 2015, Vargas et al. 2018), até o manejo químico onde o foco para controle de *S. verticillata*, deve ocorrer na pré-semeadura da cultura da soja, o qual apresenta maior flexibilidade e opções de herbicidas para o controle químico no entanto também devem contemplar os períodos de pré e pós emergência da cultura da soja visando o controle da infestação presente no campo e a redução e/ou eliminação de novos fluxos germinativos de *S. verticillata*, evitando assim o processo de reinfestação e mitigando a mato-competição com a cultura da soja no verão (Albrecht et al. 2020; Albrecht et al. 2021; da Silva et al. 2021).

Nesse contexto o controle químico de *S. verticillata* se destaca como uma das principais formas de manejo, sendo que este deve ser efetuado nos estádios iniciais de desenvolvimento, até

três pares de folhas, como proposto por (Martins e Christoffoleti 2014), trabalho no qual foi verificado que o glifosato na dose de 1080 g i.a ha⁻¹ promoveu controle próximo de 90% aos 21 dias após aplicação, ou ainda, através de herbicidas pré emergentes como o diclosulam na dose de 35 g i.a ha⁻¹, que proporcionou controle de 100% aos 60 dias após aplicação. Entretanto, várias observações de campo têm relatado a ineficiência de controle químico, especialmente com uso de glifosato quando aplicados em estádios tardios de desenvolvimento desta espécie (Mascarenhas 2000; Macedo 2003; Martins 2009; Marques 2010; Santos 2016; Fadin et al. 2018).

Inúmeros aspectos interferem na eficácia de controle proporcionada pelos herbicidas, como a suscetibilidade aos ingredientes ativos, fatores relativos a tolerância e resistência dos diferentes biótipos da espécie alvo, onde até a data do presente trabalho não há casos de resistência reportados envolvendo *S. verticillata* (Heap 2021). Mas outros fatores como a absorção inicial do herbicida e conseqüentemente a sua translocação em quantidades suficientes até o sítio de ação e a enzima-alvo de ação alvo do herbicida, alterações morfológicas na planta resultante dos diferentes estádios de desenvolvimento e interações destes com o ambiente podem influenciar o controle e a estratégia a ser adotada, como relatado por (Fadin e Monquero 2019), onde avaliando parâmetros como espessura da epiderme, número de estômatos e tricomas em diferentes estádios de desenvolvimento de *S. verticillata*, concluíram que plantas em estádios mais avançados, como em florescimento, apresentaram número reduzido de estômatos, menor espessura da folha e mais tricomas, quando comparadas aquelas em estádios iniciais de desenvolvimento. Demonstrando a interação entre ambiente, alvo e comportamento dos herbicidas glifosato e 2,4-D, maior absorção e translocação de 2,4-D e glifosato foram observados sobre plantas de *Ambrosia artemisiifolia* e *Ambrosia trifida* quando a aplicação foi realizada em temperatura mais elevada, resultando conseqüentemente em maior controle (Ganie et al. 2017).

Frequentemente, as diferenças entre a suscetibilidade de plantas ao glifosato, seja em plantas cultivadas ou daninhas, estão relacionadas com diferenças de absorção e/ou translocação do herbicida. (Fadin et al. 2018) verificaram que plantas de *S. verticillata* com 4-6 folhas apresentaram menor absorção e translocação do herbicida glifosato para regiões meristemáticas foliares/radiculares se comparadas com plantas em início do seu desenvolvimento (2-4 folhas). Plantas em pleno florescimento apresentaram menor translocação do herbicida para os meristemas radiculares, em função desse comportamento os autores verificaram também que a aplicação do glifosato em estádios iniciais do desenvolvimento da espécie foi efetiva no controle.

Além desses aspectos a associação de herbicidas visando o manejo de plantas daninhas também influenciam no resultado final de controle, o uso dos herbicidas glifosato e 2,4-D

associados é uma prática comum na agricultura brasileira, principalmente frente ao avanço da seleção e disseminação de plantas daninhas resistentes ao glifosato, esta aplicação até então estava limitada ao uso em dessecação para o plantio da cultura de soja, que ocupa a maior área plantada de grãos no Brasil, entretanto com a recente comercialização da soja geneticamente modificada tolerante aos herbicidas 2,4-D e glifosato, as aplicações em pós-emergência de soja são possíveis, inclusive utilizando os dois ativos em uma mesma aplicação, visto que existe o produto comercial formulado com ambas moléculas (Skelton et al. 2017).

Trabalhos envolvendo a associação entre glifosato e herbicidas mimetizadores da auxina, como o 2,4-D e outros, tem como principais objetivos aumentar o espectro de plantas daninhas controladas por uma única aplicação e reduzir a pressão de seleção sobre indivíduos resistentes, na literatura é possível encontrar resultados indicando sinergismo, antagonismo ou efeitos aditivos, que variam em função da espécie de planta daninha, estágio de desenvolvimento em que a aplicação é efetuada e a dose e mecanismo de ação dos herbicidas utilizados em associação (Ou et al. 2018).

Nesse sentido a associação entre 2,4-D e glifosato, objetivando o controle de *S. verticillata*, podem impactar no manejo dessa planta daninha, pois o glifosato é eficiente no seu controle somente em estádios iniciais de desenvolvimento 2 a 4 folhas (Fadin et al. 2018) ao passo que o 2,4-D não apresenta eficácia em seu manejo, dessa forma se fazem importantes pesquisas que estudem essa associação, em relação a fisiologia, desenvolvimento e controle de *S. verticillata* (Jeronimo et al. 2021).

Portanto, os objetivos deste trabalho foram determinar e quantificar a absorção e translocação de ^{14}C glifosato e ^{14}C 2,4-D na associação de diferentes doses dos dois herbicidas sobre plantas de *S. verticillata* no estágio fenológico de dois a três pares de ramos, verificar a eficácia de controle de diferentes doses dos herbicidas glifosato e 2,4-D e o acúmulo de ácido chiquímico nos tecidos da parte aérea de plantas de *S. verticillata* nos tratamentos de glifosato e 2,4-D isolados e associados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta das sementes e obtenção de plantas

As sementes maduras foram coletadas no mês de Agosto de 2017 a partir de plantas de *S. verticillata* presentes em campos cultivados há pelo menos 10 anos com soja, no município de Uruçuí – Piauí (Latitude: 07° 21' 33.7" Sul e Longitude: 44° 24' 58.3" Oeste) e altitude de 350 metros. Posteriormente as sementes foram enviadas para a Estação Experimental da Corteva Agriscience, em Mogi Mirim – SP (686 m de altitude; latitude de 22°27'02.26"S e longitude de 47°04'10.47"W).

Nessa estação experimental foi realizada a semeadura em vasos com capacidade volumétrica de 0,5 L, preenchidos com substrato Plantmax, cuja composição e características químicas estão dispostas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição e características químicas do substrato Plantmax utilizado nos vasos para desenvolvimento das plantas de *S. verticillata*.

Substrato	pH	Al	Ca+ Mg	H+ Al	P	K	M. O.	SB	t	m	T	V
	H ₂ O	Me/100cc			mg/l		g/dm ₃		%			%
Plantmax ^R	5,70	1,11	31,43	6,36	1.301,70	1.870,00	2,37	36,22	37,33	2,97	42,58	85,07

Cinco sementes de *S. verticillata* foram semeadas sobre a superfície de cada vaso na profundidade de 0,5 cm contendo o substrato. Após a emergência e a emissão do primeiro par de folhas, que ocorreu após 10 dias, o desbaste foi efetuado e apenas uma planta foi deixada por vaso os quais foram mantidos em casa de vegetação, objetivando o maior controle experimental (Figura 1). Todas as etapas experimentais foram conduzidas utilizando sementes provenientes da mesma coleta e seguindo a mesma metodologia, alterando apenas a época de execução.



Figura 1. Plantas cultivadas de *S. verticillata* em dois estádios de desenvolvimento, plantas no estágio vegetativo (a) e planta perenizada em pleno florescimento (b) 180 dias após a emergência em casa de vegetação no município de Mogi Mirim/SP. Fonte: Arquivo pessoal.

2.2. Locais de realização do experimento

Os experimentos foram conduzidos em laboratórios e casa de vegetação. Os experimentos relativos aos herbicidas radiomarcado foram realizados no laboratório de Ecotoxicologia localizado no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), no município de Piracicaba/SP, no período de agosto a dezembro de 2017.

A obtenção das plântulas e condução dos experimentos de controle foram realizados na Estação Experimental da Corteva Agriscience, em Mogi Mirim – SP (686 m de altitude; latitude de 22°27'02.26”S e longitude de 47°04'10.47”W), no período de setembro de 2017 a março de 2018.

O experimento de acúmulo de ácido chiquímico foi realizado no Laboratório de Química Orgânica de Produtos Naturais do Departamento de Ciências Exatas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", uma unidade da Universidade de São Paulo, no município de Piracicaba/SP, no período de janeiro a abril de 2019.

2.3. Absorção foliar e translocação de glifosato e 2,4-D radiomarcados em *S. verticillata*

Os experimentos foram realizados em laboratório. Os tratamentos foram separados em dois experimentos, sendo que cada experimento contou com 3 repetições caracterizadas, sendo que cada uma dessas repetições foram constituídas por uma planta de *S. verticillata* e a aplicação dos tratamentos ocorreu no dia 14 de novembro de 2017. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso no esquema fatorial 2 x 4, sendo o primeiro fator relativo a duas doses de glifosato (720 e 1440 g e.a ha⁻¹) e o segundo fator relativo a quatro doses de 2,4-D (0; 167,5; 335 e 670 g e.a ha⁻¹) para o primeiro experimento. O experimento 1 foi constituído pelos tratamentos em que o glifosato radiomarcado foi adotado (Tabela 2).

Tabela 2. Tratamentos herbicidas radiomarcados com glifosato e doses dos fatores glifosato e 2,4-D aplicadas sobre as plantas de *S. verticillata* no experimento 1.

Fator A Glifosato (g e.a ha⁻¹*)	Fator B 2,4-D (g e.a ha⁻¹)
720	0
1440	0
720	167,5
720	335
720	670
1440	167,5
1440	335
1440	670

* g e.a ha⁻¹ = gramas de equivalente ácido por hectare

No segundo experimento, também se adotou o delineamento experimental de blocos ao acaso, em esquema fatorial 3 x 3, sendo três doses de glifosato (0; 720 e 1440 g e.a ha⁻¹) e três doses de 2,4-D (167,5; 335 e 670 g e.a ha⁻¹), o experimento 2 apresentou os tratamentos com 2,4-D radiomarcado (Tabela 3). Os produtos comerciais adotados em ambos experimentos foram Roundup Transorb (sal de isopropilamina de glifosato, concentração de 480 g e.a L⁻¹) e DMA 806BR (sal de dimetilamina de 2,4-D, concentração de 670 g e.a L⁻¹).

Tabela 3. Tratamentos herbicidas radiomarcados com 2,4-D e doses dos fatores glifosato e 2,4-D aplicadas sobre as plantas de *S. verticillata* no experimento 2.

Fator A Glifosato (g e.a ha⁻¹*)	Fator B 2,4-D (g e.a ha⁻¹)
0	167,5
0	335
0	670
720	167,5
720	335
720	670
1440	167,5
1440	335
1440	670

* g e.a ha⁻¹ = gramas de equivalente ácido por hectare

A primeira etapa do experimento foi constituída da seleção das plantas, as quais foram obtidas previamente em casa de vegetação. Dessa forma, objetivando a maior homogeneidade experiemntal, em todas as unidades experimentais, foram utilizadas plantas no estágio de desenvolvimento de 2 a 3 pares de ramos laterais visíveis, o que resultou em plantas com altura entre 15 a 20 cm. Essas plantas foram retiradas da casa de vegetação apenas no momento da aplicação dos tratamentos de herbicidas com e sem produtos radiomarcados.

De forma previa a aplicação dos herbicidas, buscando a maior homogeneidade e controle experimental possível, o par de folhas opostas inseridos no terceiro nó da haste principal foi protegido com um material plástico (Figura 2). Esse procedimento foi adotado visando evitar que essa folha recebesse e conseqüentemente absorvesse os herbicidas não radiomarcados, protegendo as mesmas, pois em um segundo momento essas folhas receberam a aplicação do herbicida radiomarcado.



Figura 2. Proteção sobre o par de folhas opostas de *S. verticillata* com superfície plástica antes da aplicação dos herbicidas comerciais sobre a planta.

A aplicação da solução contendo os herbicidas não radiomarcados (formulações comerciais) foi efetuada utilizando equipamento costal pressurizado a CO_2 , calibrado para fornecer volume de calda de 100 L ha^{-1} , munido de pontas do tipo leque, modelo XR11002 VS da empresa Teejet. Imediatamente após aplicação dos herbicidas não radiomarcados, foi realizada a remoção da estrutura plástica de proteção posicionada estrategicamente nas duas folhas opostas do terceiro nó da haste principal, e estas receberam a aplicação da solução do herbicida radiomarcado (Figura 3).

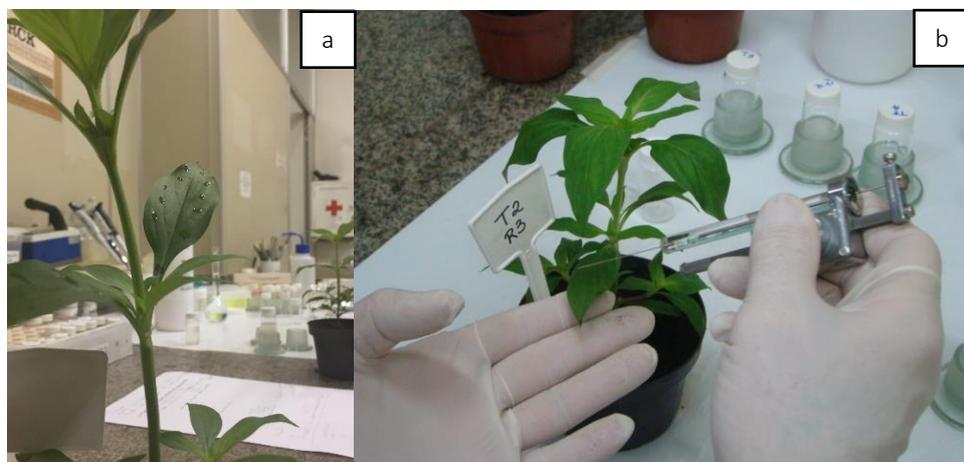


Figura 3. Aplicação da solução radiomarcada nos dois pares de folhas opostas do terceiro nó da haste principal de *S. verticillata*. Detalhe para as 10 gotas de $1 \mu\text{L}$ aplicadas em cada uma das folhas (a) e equipamento utilizado no processo (b).

A solução do experimento 1 foi composta pelo ^{14}C glifosato radiomarcado no fosfometil radical (C3), atividade específica de $1,85 \text{ GBq mmol}^{-1}$ e pureza de 99%, resultando em uma solução de trabalho de 80 kBq, mais uma alíquota da solução de herbicida não radiomarcado do respectivo tratamento. A solução do experimento 2 foi composta pelo ^{14}C 2,4-D radiomarcado uniformemente no anel, com atividade específica de $2,516 \text{ Bq mg}^{-1}$ e pureza de 99%, resultando em uma solução de trabalho de 90 kBq, mais uma alíquota da solução de herbicida não radiomarcado do respectivo tratamento. As soluções contendo os herbicidas radiomarcados foram aplicadas com auxílio de microaplicador (Hamilton PB6000 Dispenser, Hamilton Co. EUA), utilizando 10 gotas de $1 \mu\text{L}$ em cada folha selecionada de cada tratamento, totalizando $20 \mu\text{L}$ por planta.

Duas alíquotas da solução de cada tratamento aplicada nas plantas foram inseridas em vials individuais (recipientes de vidro com volume de 20 mL) e inseridas no equipamento para análise via espectrometria de cintilação líquida (Tri-Carb 2910 TR), para leitura da radioatividade presente. No experimento 1 (^{14}C glifosato), os valores de radioatividade total de cada tratamento aplicado em cada planta apresentou média de 125,755.78 dpm, já no experimento 2 (^{14}C 2,4-D) foi de 112,660.41 dpm.

As plantas permaneceram em mesmas condições no laboratório por um período de 72 horas após aplicação dos tratamentos (HAA). Com o objetivo de quantificar a radioatividade não absorvida, o par de folhas tratadas foi destacado da planta e cada folha lavada com 5 mL (sendo lavadas cinco vezes com auxílio de uma pipeta calibrada para 1 mL) de solução contendo 50% metanol e 50% água para lavar o herbicida não absorvido. Do líquido proveniente dessa lavagem, foram retiradas duas alíquotas de 0,5 mL com objetivo de gerar duas repetições para cada folha, que foram misturadas com 10 mL do líquido de cintilação Instagel Plus para análise via espectrometria de cintilação líquida (Tri-Carb 2910 TR), para leitura da radioatividade não absorvida, seguindo os parâmetros descritos na **Equação 1**.

Equação 1:

$$\%H_{\text{ñabs}} = \frac{C^{14} \text{ solução de lavagem} - C^{14} \text{ solução branca}}{C^{14} \text{ total aplicado}} \times 100$$

Onde %H_{ñabs} = Percentual do herbicida não absorvido pelas plantas; C¹⁴ solução de lavagem = quantidade de C¹⁴ detectada na solução de lavagem das folhas tratadas; C¹⁴ solução branca. = quantidade de C¹⁴ detectada em solução composta pelo líquido de cintilação; C¹⁴ total aplicado = quantidade de C¹⁴ total aplicada sobre a planta.

Logo após o destaque das folhas tratadas seguido da lavagem, as plantas foram removidas dos vasos em sua totalidade e suas raízes lavadas em água corrente, para então serem

acomodadas para secar em jornal (Figura 4). As 72 HAA, uma repetição de cada tratamento foi selecionada para a obtenção de uma autoradiografia utilizando o equipamento Cyclone Plus Storage Phosphor System, modelo C431200 (Perkin Elmer), com o objetivo de gerar uma análise qualitativa da translocação dos herbicidas para as diferentes partes da planta, processo no qual quanto mais escuro a imagem, maior a presença do herbicida radiomarcado (Figura 5).

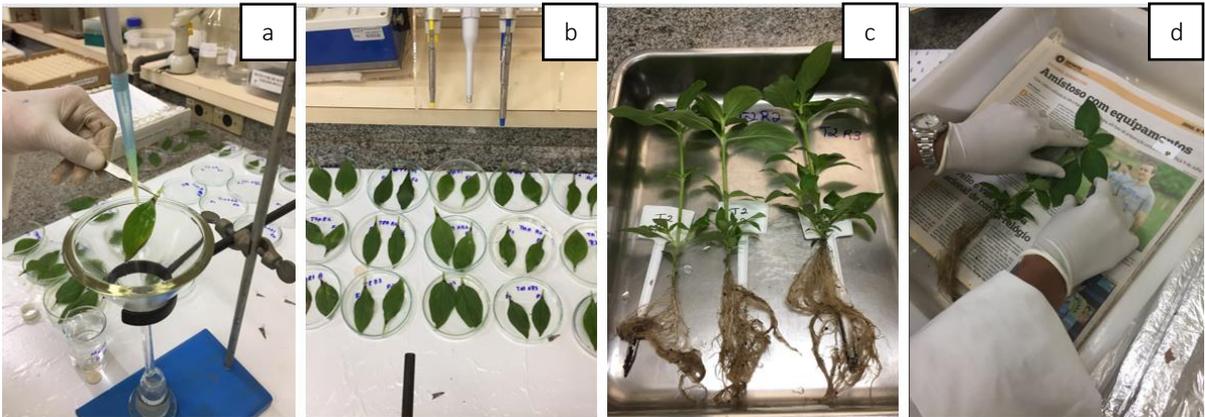


Figura 4. Lavagem do par de folhas opostas às 72 horas após aplicação da solução herbicida radiomarcada (a, b), seguido pela remoção das plantas do substrato e lavagem das raízes (c) e elaboração da exsicata com uma repetição de cada tratamento (d).

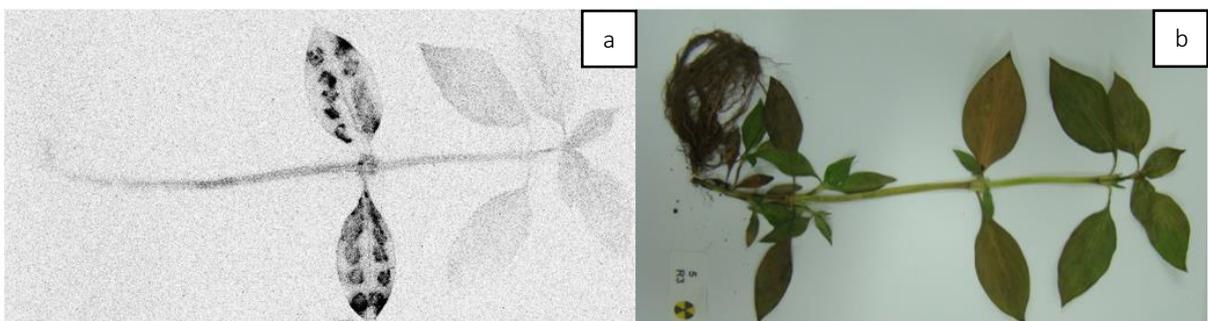


Figura 5. Autoradiografia de uma repetição de um dos tratamentos (a), ao lado da fotografia de sua respectiva exsicata (b). As partes mais escuras da figura (a) indicam a maior presença do herbicida radiomarcado.

Aos 7 dias após o início da secagem, as plantas foram seccionadas em folhas tratadas, ou seja, folhas onde o produto radiomarcado foi aplicado, folhas acima e folhas abaixo daquelas tratadas, caule e raízes, as partes seccionadas foram então secas em forno a 50°C por 48 horas e submetidas a combustão em um oxidador biológico (Biological Oxidizer OX500) para quantificação do herbicida radiomarcado presente nos tecidos. Posteriormente a radioatividade foi determinada através da análise via espectrometria de cintilação líquida (Figura 6).

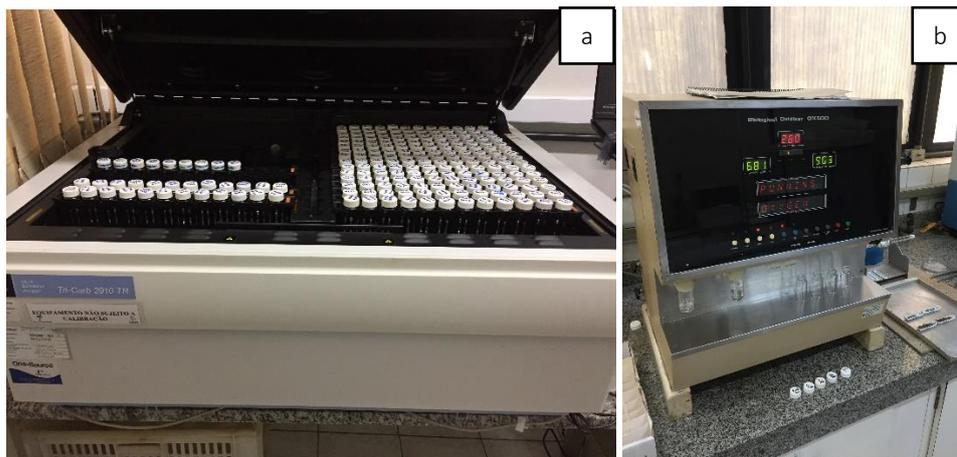


Figura 6. Equipamento de espectrometria de cintilação líquida modelo Tri-Carb 2910 TR (a) e oxidador biológico OX500 (b).

A absorção do glifosato ou 2,4-D foi determinada como porcentagem de radioatividade presente no interior da planta em relação à radioatividade total aplicada em cada tratamento, para isso, os dados obtidos de cada parte da planta seccionada foram inseridos utilizando os parâmetros descritos na **Equação 2** e posteriormente somados para se obter a radioatividade total absorvida pela planta.

Equação 2:

$$\%Habs = \frac{[(C^{14} \text{ tec.ox.} - C^{14} \text{ solução branca})/recuperação \text{ oxi}]}{C^{14} \text{ total aplicado}} \times 100$$

Onde %Habs = Percentual do herbicida absorvido pelas plantas por parte seccionada; $C^{14} \text{ tec.ox.}$ = quantidade de C^{14} detectada nos tecidos oxidados da parte seccionada que se deseja obter o %Habs; $C^{14} \text{ solução branca.}$ = quantidade de C^{14} detectada em solução composta pelo líquido de cintilação; Recuperação oxi = percentual de recuperação do equipamento de oxidação; $C^{14} \text{ total aplicado}$ = quantidade de C^{14} total aplicada sobre a planta.

Para o cálculo da translocação do herbicida para as diferentes partes da planta, utilizou-se o valor do percentual de herbicida total absorvido pela planta, menos o percentual de herbicida localizado nas folhas tratadas para cada tratamento. Com todos os dados coletados foi possível realizar o cálculo do balanço de massa baseado na quantidade de produto absorvido, não absorvido e translocado para as diferentes partes seccionadas de cada planta, para assim em conjunto com as autoradiografias analisar como os diferentes tratamentos comportaram-se.

2.4. Resposta da planta daninha *S. verticillata* a diferentes doses de glifosato e 2,4-D

Esse experimento foi realizado em laboratório e câmara de crescimento, as unidades experimentais foram constituídas pelos vasos com capacidade de 0,5 L e as plantas de *S. verticillata* no estágio de desenvolvimento de 2 a 3 pares de ramos laterais e altura entre 15 a 20 cm, quando as plantas atingiram o estágio de desenvolvimento indicado, as mesmas receberam a aplicação dos tratamentos. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente aleatorizado em blocos, os tratamentos seguiram o esquema fatorial com 4 repetições cada, sendo compostos por dois fatores, glifosato e 2,4-D com 6 níveis cada, representados por 6 doses de glifosato e 6 doses de 2,4-D, totalizando assim 36 tratamentos ou interações entre os níveis dos fatores.

Os tratamentos foram constituídos da aplicação de glifosato e 2,4-D, isolados e associados, visando o controle de *S. verticillata*. Os herbicidas foram aplicados em seis doses cada, além de todas as associações entre os níveis dos fatores, representados pelas doses dos dois herbicidas, sendo glifosato nas doses de 0; 180; 360; 720; 1440; 2880 g e.a ha⁻¹ e 2,4-D nas doses de 0; 83,75; 167,5; 335; 670; 1340 g e.a ha⁻¹, resultando em 36 interações, obedecendo as seguintes proporções onde a letra D significa a dose comercial utilizada de cada herbicida, 0D, 1/8D, 1/4D, 1/2D, D e 2D, a dose comercial do herbicida glifosato foi de 1440 g e.a ha⁻¹ e a do 2,4-D de 670 g e.a ha⁻¹ e os produtos comerciais adotados foram Roundup Transorb (sal de isopropilamina de glifosato, concentração de 480 g e.a L⁻¹) e DMA 806BR (sal de dimetilamina de 2,4-D, concentração de 670 g e.a L⁻¹), respectivamente.

A aplicação dos tratamentos foi realizada em câmara de aplicação (Generation III Research Sprayer – Devries Manufacturing) na estação experimental da empresa Corteva Agriscience, localizada no município de Mogi Mirim/SP (Figura 7). As plantas foram submetidas as aplicações dos herbicidas nas diferentes doses e combinações utilizando ponta do tipo leque, modelo Teejet XR11002 VS, velocidade de 1,5 Km h⁻¹, pressão de 40 psi e vazão de 100 L ha⁻¹.



Figura 7. Plantas de *S. verticillata* separadas em bancadas para a aplicação dos herbicidas (a) e plantas de uma repetição dentro da câmara de aplicação Generation III Research Sprayer – Devries Manufacturing (b).

Imediatamente após a aplicação dos tratamentos os vasos com as plantas foram transportados até uma câmara de crescimento (Conviron GR192) com condições de temperatura, umidade e luminosidade controladas, sendo mantidas a 27°C constante, umidade do solo na capacidade de campo, umidade relativa do ar em 65% e fotoperíodo de 12h luz e 12h escuro (Figura 8). O molhamento das plantas foi direcionado ao solo, não havendo contato com a parte aéreas das mesmas.



Figura 8. Plantas de *S. verticillata* em câmara de crescimento Convirox GR192 após aplicação dos herbicidas.

Avaliações de porcentagem visual de controle das plantas foram efetuadas aos 7, 14 e 21 dias após as aplicações, seguindo a escala visual de notas proposta pela ALAM (1974), que utiliza uma escala percentual de notas, onde zero corresponde a ausência de controle (0%) e cem corresponde a morte das plantas (100%).

Após a última avaliação visual efetuada aos 21 dias após as aplicações, as plantas foram removidas em totalidade dos vasos, a parte aérea foi cortada e as raízes lavadas em água corrente, as secções das plantas (parte aérea e sistema radicular) foram acondicionados em sacos de papel de forma separada e levados para estufa de circulação forçada de ar com temperatura de $72^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, em seguida a massa seca das duas partes das plantas foi determinada através de balança analítica.

2.5. Determinação do acúmulo de ácido chiquímico após aplicação de glifosato, 2,4-D e da associação entre os dois herbicidas sobre plantas de *S. verticillata*

Com o objetivo de investigar a atuação do glifosato, 2,4-D e da associação entre os dois herbicidas decidiu-se realizar a determinação do acúmulo de ácido chiquímico nas plantas de *S. verticillata* após a aplicação de diferentes doses isoladas e associadas entre os dois herbicidas.

Para tal finalidade, a dose adotada de cada herbicida foi definida com base na proporção entre glifosato e 2,4-D, que apresentou a maior redução dos parâmetros previamente avaliados, absorção, translocação e eficácia de controle, quando comparado ao glifosato isolado (Tabela 4).

Tabela 4. Tratamentos herbicidas aplicados sobre as plantas de *S. verticillata* para determinação do acúmulo de ácido chiquímico nos tecidos da parte aérea (folhas + ramos) aos 3, 7 e 14 dias após aplicação.

Fator A Glifosato (g e.a ha⁻¹*)	Fator B 2,4-D (g e.a ha⁻¹)	Remoção da parte aérea (dias após aplicação)
720	0	3; 7 e 14
0	670	3; 7 e 14
720	670	3; 7 e 14
0	0	3; 7 e 14

* g e.a ha⁻¹ = gramas de equivalente ácido por hectare

Utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso com três repetições, organizados em esquema fatorial constituídos por dois fatores herbicidas com dois níveis cada (2 x 2), sendo o fator A representado pelo glifosato nas doses de 0 e 720 g e.a ha⁻¹ e o fator B representado por 2,4-D nas doses de 0 e 670 g e.a ha⁻¹. Os produtos comerciais adotados foram Roundup Transorb (sal de isopropilamina de glifosato, concentração de 480 g e.a L⁻¹) e DMA 806BR (sal de dimetilamina de 2,4-D, concentração de 670 g e.a L⁻¹).

Para a execução do experimento as sementes provenientes das mesmas coletas utilizadas para realização dos experimentos descritos anteriormente foram utilizadas. No momento em que as plantas atingiram o estágio de desenvolvimento de 2 a 3 pares de ramos laterais e altura de 15 a 20 cm (Figura 9), os herbicidas foram aplicados em câmara de aplicação (Generation III Research Sprayer – Devries Manufacturing) na estação experimental da empresa Corteva Agriscience, localizada no município de Mogi Mirim/SP. As plantas foram submetidas as aplicações dos herbicidas nas diferentes doses e combinações utilizando ponta do tipo leque, modelo Teejet XR11002 VS, velocidade de 1,5 Km h⁻¹, pressão de 40 psi e vazão de 100 L ha⁻¹.



Figura 9. Aspecto geral das plantas de *S. verticillata* no momento da aplicação dos tratamentos herbicidas (a) e plantas logo após a aplicação em câmara de aplicação (b).

Imediatamente após a aplicação dos tratamentos os vasos com as plantas foram transportados até uma câmara de crescimento (Conviron GR192) com condições de temperatura, umidade e luminosidade controladas, sendo mantidas a 27°C constante, umidade do solo na capacidade de campo, umidade relativa do ar em 65% e fotoperíodo de 12h luz e 12h escuro. O molhamento das plantas se deu sempre direcionado ao solo, não havendo contato com a parte aéreas das mesmas.

As plantas foram mantidas em condição controlada até o momento da coleta da parte aérea (folhas + ramos), que se deu aos 3; 7 e 14 dias após aplicação dos herbicidas, intervalo suficiente para o atingimento do pico de concentração do ácido chiquímico (González-Torralva et al. 2012). A parte aérea foi coletada em sua totalidade, acondicionada em sacos de papel, armazenadas em freezer a temperatura de -80°C e quando todos os momentos de coleta foram atingidos, as amostras foram liofilizadas, em seguida trituradas e acondicionadas em frascos individuais. Os frascos foram transportados até o Laboratório de Química Orgânica de Produtos Naturais da Esalq/USP, para início do processo de extração e quantificação do ácido chiquímico nos diferentes tratamentos, seguindo a metodologia descrita.

Inicialmente foram determinadas as curvas de calibração através do padrão analítico de ácido chiquímico (99% Sigma-Aldrich), onde foram diluídos em fase móvel 8 diferentes concentrações conhecidas de ácido chiquímico (2,5; 5; 10; 50; 100; 200; 600 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), a fase móvel foi constituída por 95% água acidificada a pH 3 com ácido fosfórico e 5% de metanol e para manter o mesmo padrão na solução utilizada para construção da curva de calibração e para leitura dos tratamentos, adicionou-se à fase móvel a solução ácida utilizada no processo de extração e solução de NaOH visando neutralizar a acidez. Dessa forma a solução de cada tratamento foi composta pela concentração de ácido chiquímico diluído em água, 6 mL de

solução acidificada com ácido clorídrico, 2 mL de fase móvel e 2 mL de NaOH, compondo assim 10 mL.

O tempo de retenção obtido para o ácido chiquímico foi de 3,067 minutos, Figura 10 e com as leituras da área do pico de cada concentração, foi possível criar a regressão linear considerando a área do pico de cada concentração conhecida. Dessa forma obteve-se correlação positiva com coeficiente de determinação $R^2 = 0,9931$ (Figura 11).

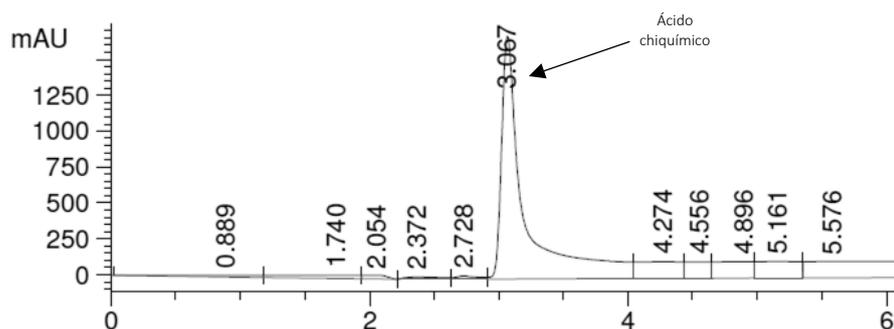


Figura 10. Cromatografia da concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido chiquímico padrão analítico (Sigma-Aldrich 99%), destaque para a área do pico de ácido chiquímico no tempo de retenção de 3.067 minutos.

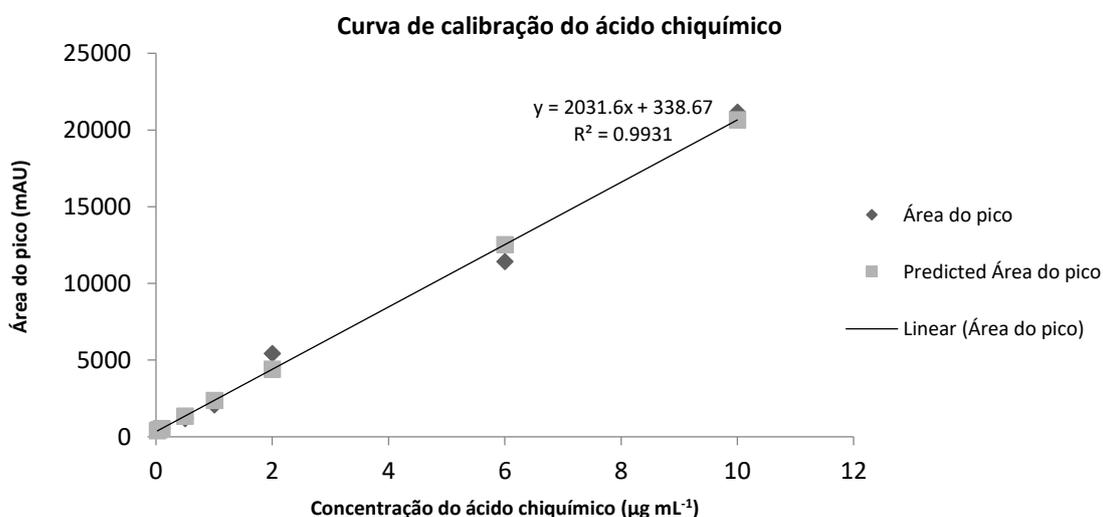


Figura 11. Curva de calibração do ácido chiquímico sobre os dados da área do pico de cada concentração conhecida obtidos através da construção da curva de calibração contendo 8 concentrações de padrão analítico de ácido chiquímico (99% Sigma-Aldrich).

Para o processo de extração do ácido chiquímico das amostras, inicialmente pesou-se 200 mg de tecido triturado de cada repetição de cada tratamento e acondicionou o material em tubos de teflon onde 3 mL de solução contendo ácido clorídrico 0,25 N foi adicionado. O material seguiu para agitação por 14 horas a 150 rpm, em seguida recebeu banho de ultrassom

por 24 minutos. Posteriormente os tubos foram centrifugados a 11.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante separado com seringa, avolumado para 5 mL com fase móvel, onde foi coletado uma alíquota com seringa e filtro de 0,45 µm para injeção de um volume de 1,5 mL em cada vial inserido no cromatógrafo (Figura 12), metodologia similiar a utilizada por (Zelaya et al. 2011).



Figura 12. Fotos dos processos envolvidos durante a extração do ácido chiquímico de cada amostra, a partir da inserção da parte aérea das plantas liofilizadas e trituradas em tubos com adição de solução acidificada (a), passando pela agitação (b), banho de ultrassom (c), separação do sobrenadante após centrifugação (d), filtragem (e) e inserção nos vials para leitura em HPLC (f).

A determinação do acúmulo de ácido chiquímico foi efetuada utilizando a técnica de HPLC (High performance liquid chromatography), utilizando um cromatógrafo líquido (Agilent, série 1200), equipado com bomba quaternária, injetor automático, degaseificador e detectores de arranjo de diodos (DAD) (Ivanova-Petropulos et al. 2020). Foi utilizado a coluna (Kromasil C18, 250 X 4,6 mm : 100 – 5 µm), mantida a temperatura de 30°C e o volume de injeção de 10 µL. A composição do solvente da fase móvel foi água ajustada a pH 3 com ácido fosfórico e metanol (95 : 5 %). O fluxo de 1 mL min⁻¹ e o comprimento de onda do detector DAD foi fixado para 212 nm.

Os dados da área do pico obtidos através da leitura de cada tratamento foram inseridos na equação da reta da curva de calibração:

$$y = 2031.6x + 338.67$$

Onde y = área do pico (mAU); x = concentração de ácido chiquímico (µg mL⁻¹). Assim, substituindo as variáveis conhecidas obteve-se a concentração de ácido chiquímico presente na amostra de cada um dos tratamentos aos 3, 7 e 14 dias após a aplicação.

2.6. Análise estatística

Para todos os experimentos os dados obtidos foram submetidos a análise de variância Scheffe (1999) utilizando o software Sisvar (versão 5.8) ao nível de significância de 95% e quando significativos procedeu-se com o teste de comparação múltiplo de médias mais adequado para o conjunto de dados específico (Ferreira 2011).

O teste de Tukey ao nível de 0,05% de probabilidade foi adotado para análise dos dados dos experimentos com moléculas radiomarcadas (percentual não absorvido, absorvido e translocado dos ingredientes ativos radiomarcados) e de quantificação do ácido chiquímico utilizando o software Sisvar (versão 5.8).

Para o experimento de eficácia de controle o teste de Scott-Knott ao nível de 0,05% de probabilidade foi adotado, visto que devido ao elevado número de tratamentos, outros testes geraram elevado número de sobreposições, o que dificultou a interpretação dos tratamentos, dessa forma, o teste de Scott-Knott foi o mais indicado por realizar o agrupamento das médias dos tratamentos semelhantes, permitindo analisar os tratamentos de forma mais clara (Jelihovschi et al. 2014). O teste também foi utilizado para análise dos dados de matéria seca da parte aérea e raízes utilizando o software Sisvar (versão 5.8).

Todos os gráficos no formato de boxplots foram construídos através do software estatístico Statmart, enquanto o gráfico contendo a regressão linear do padrão analítico de ácido chiquímico elaborado via Excel.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Absorção foliar e translocação de glifosato radiomarcado em *S. verticillata*

Os valores médios obtidos para os parâmetros avaliados envolvendo o ^{14}C glifosato, percentual não absorvido, absorvido e translocado pelas plantas de *S. verticillata* às 72 horas após aplicação, podem ser observados na tabela 5, dados referentes ao balanço de massa dos diferentes tratamentos.

Tabela 5. Balanço de massa proporcionado pelos diferentes tratamentos herbicidas. Valores indicam o percentual médio total de ^{14}C glifosato não absorvido, absorvido e translocado pelas plantas de *S. verticillata* às 72 horas após aplicação dos tratamentos.

Fator A Glifosato (g e.a ha ^{-1*})	Fator B 2,4-D (g e.a ha ⁻¹)	Percentual (%)		
		Não absorvido	Absorvido	Translocado
720	0	65.55	33.61	5.33
1440	0	53.71	15.27	2.15
720	167,5	53.40	9.69	1.76
720	335	63.63	8.70	1.36
720	670	65.52	11.18	1.19
1440	167,5	85.64	18.15	3.71
1440	335	57.35	16.31	2.46
1440	670	61.65	13.92	1.61

g e.a ha⁻¹ = gramas de equivalente ácido por hectare

Para o percentual do ^{14}C glifosato não absorvido, através da análise de variância, houve efeito significativo da interação glifosato versus 2,4-D (p valor = 0.0007), assim, como a interação foi significativa deve-se desdobrar os resultados obtidos em níveis do fator glifosato dentro de cada nível do fator 2,4-D e dos níveis de 2,4-D dentro de cada nível de glifosato (Tabela 6).

Tabela 6. Percentual médio de glifosato não absorvido às 72 horas após aplicação dos tratamentos.

Fator A glifosato (g e.a ha ^{-1a})	Fator B 2,4-D (g e.a ha ⁻¹)							
	0		167.5		335		670	
720	65.55	a A	53.4	b A	63.63	a A	65.51	a A
1440	53.71	a B	85.64	a A	57.35	a B	61.66	a B

médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha são consideradas iguais através do teste de Tukey ($p < 0.05$)
DMS^b 13.37; DMS^c 18.12
CV^d (%) 12.06

^ag e.a ha⁻¹ = gramas de equivalente ácido por hectare.

^bDMS = diferença mínima significativa (desdobramento de glifosato dentro de cada nível de 2,4-D).

^cDMS = diferença mínima significativa (desdobramento de 2,4-D dentro de cada nível de glifosato).

^dCV = coeficiente de variação.

A aplicação de glifosato na dose de 720 g e.a ha⁻¹ isolado ou associado ao 2,4-D resultou em um percentual total não absorvido considerado estatisticamente igual, variando de 53.4 a 65.55%, já para a dose de 1440 g e.a ha⁻¹ de glifosato, quando associado com a dose de 167,5 g e.a ha⁻¹ de 2,4-D, houve maior porcentagem do glifosato não absorvido (85.64%) do que quando comparado ao glifosato isolado ou associado com as doses de 335 e 670 g e.a ha⁻¹ de 2,4-D, variando de 53.71 a 61.66%. Quando comparado, as duas doses de glifosato isoladas ou associadas resultaram em percentual não absorvido estatisticamente igual, ou seja, independente da dose de glifosato a não absorção é a mesma, com exceção do tratamento entre glifosato a 1440 g e.a ha⁻¹ com 167,5 g e.a ha⁻¹ de 2,4-D, onde o percentual não absorvido foi maior (Tabela 6).

Para o percentual do ¹⁴C glifosato absorvido, através da análise de variância, houve efeito significativo da interação glifosato versus 2,4-D (p valor = 0.0001), assim, como a interação foi significativa deve-se desdobrar os resultados obtidos em níveis do fator glifosato dentro de cada nível do fator 2,4-D e dos níveis de 2,4-D dentro de cada nível de glifosato (Tabela 7).

Tabela 7. Percentual médio de glifosato absorvido às 72 horas após aplicação dos tratamentos.

Fator A glifosato (g e.a ha ^{-1a})	Fator B 2,4-D (g e.a ha ⁻¹)			
	0	167.5	335	670
720	33.61 a A	9.69 b B	8.7 b B	11.18 a B
1440	15.27 b A	18.15 a A	16.31 a A	13.92 a A

médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha são consideradas iguais através do teste de Tukey (p<0.05)
DMS^b 7.05; DMS^c 9.56
CV^d(%) 25.42

^ag e.a ha⁻¹ = gramas de equivalente ácido por hectare.

^bDMS = diferença mínima significativa (desdobramento de glifosato dentro de cada nível de 2,4-D).

^cDMS = diferença mínima significativa (desdobramento de 2,4-D dentro de cada nível de glifosato).

^dCV = coeficiente de variação.

O glifosato na dose de 720 g e.a ha⁻¹ apresentou absorção de 33.61% quando aplicado isolado, entretanto quando associado a todas as doses testadas de 2,4-D a absorção reduziu significativamente, variando de 8.7 a 11.18%, o que representou redução superior a 70% quando comparado com a aplicação do glifosato isolado. Por outro lado para a dose de 1440 g e.a ha⁻¹ de glifosato a absorção não foi influenciada, independente da dose de 2,4-D associada ou quando aplicado isolado, como pode ser observado na figura 13.

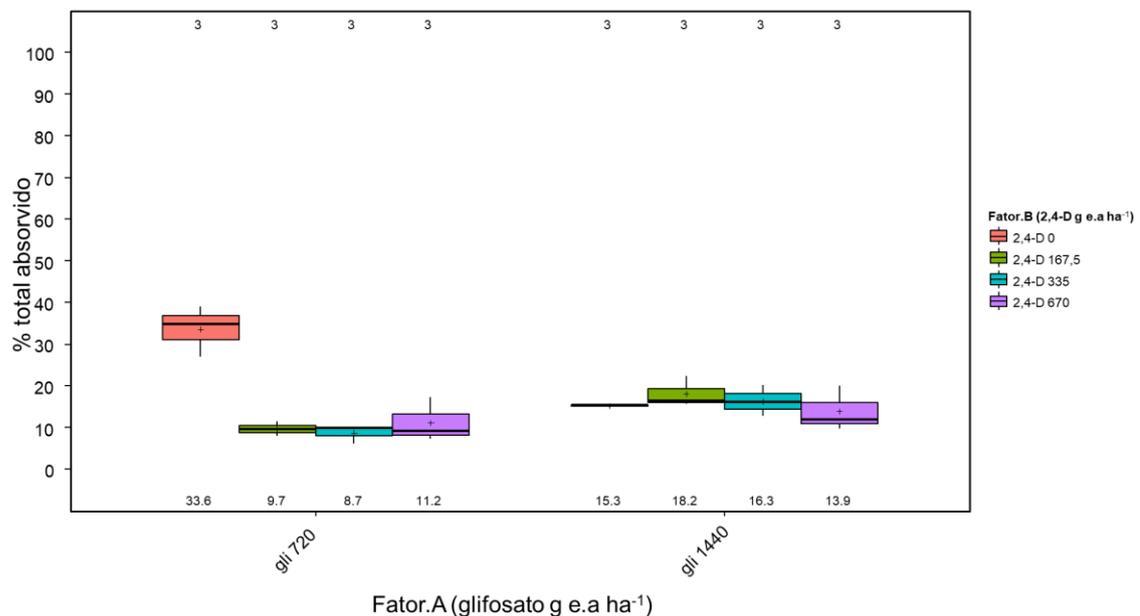


Figura 13. Percentual total de ¹⁴C glifosato absorvido às 72 horas após aplicação dos tratamentos contendo glifosato radiomarcado sobre as plantas de *S. verticillata*. Os números abaixo de cada boxplot indicam a média e o valor acima o número de repetições.

Em relação as duas doses de glifosato, 720 e 1440 g e.a ha⁻¹, aplicadas isoladas, houve maior absorção através da dose de 720 g e.a ha⁻¹, diferindo significativamente da maior dose.

Segundo (Li et al. 2020) os mecanismos de redução da absorção e translocação do glifosato em função da associação com 2,4-D não estão claros, mas podem ser devido ao complexo químico de trocas catiônicas e as interações físicas ou biológicas. Além desses a combinação de diferentes formulações tanto do 2,4-D (éster de butoxietil, dietalmina, dimetilamina e colina) com glifosato (sal de potássio e isopropilamina), podem culminar em maiores ou menores efeitos fitotóxicos do glifosato em plantas, antagonismo ou efeitos fitotóxicos mais expressivos resultando em sinergismo, em virtude da menor absorção do produto em virtude dos resultados finais da associação. As diversas espécies de plantas daninhas podem apresentar comportamento distinto para o glifosato, mesmo sendo esse considerado um produto sistêmico, (Monquero et al. 2004) encontrou diferentes níveis de absorção após aplicação de 720 g e.a ha⁻¹ de glifosato sobre *Amaranthus hybridus* (93,5%), *Ipomoea grandifolia* (80%) e *Commelina benghalensis* (66,1%) as 72 HAA, ou seja, valor no mínimo 2 vezes superior ao percentual de absorção da mesma dose de glifosato em *S. verticillata*.

Os resultados corroboram com aqueles obtidos por (Lym 2000) onde estudando a absorção e translocação de glifosato e 2,4-D em *Euphorbia esula* as 72 HAA, constatou redução da absorção de glifosato em torno de 50% quando o produto foi associado ao 2,4-D em dois estádios de desenvolvimento distintos. Em trabalho conduzido por (Fadin et al. 2018), 3 diferentes estádios de desenvolvimento de *S. verticillata* foram utilizados, onde a absorção média na dose de 720 g e.a ha⁻¹ de glifosato foi de 31%, resultado este semelhante ao encontrado após aplicação do primeiro nível do fator glifosato.

Para o percentual do ¹⁴C glifosato translocado, através da análise de variância, houve efeito significativo da interação glifosato versus 2,4-D (p valor = 0.0104), assim, como a interação foi significativa deve-se desdobrar os resultados obtidos em níveis do fator glifosato dentro de cada nível do fator 2,4-D e dos níveis de 2,4-D dentro de cada nível de glifosato (Tabela 8).

Tabela 8. Percentual médio de glifosato translocado às 72 horas após aplicação dos tratamentos.

Fator A glifosato (g e.a ha ^{-1a})	Fator B 2,4-D (g e.a ha ⁻¹)			
	0	167.5	335	670
720	5.33 a A	1.77 a B	1.36 a B	1.19 a B
1440	2.16 b A	3.71 a A	2.46 a A	1.61 a A

médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha são consideradas iguais através do teste de Tukey (p<0.05)
DMS^b 2.05; DMS^c 2.79
CV^d(%) 47.92

^ag e.a ha⁻¹ = gramas de equivalente ácido por hectare.

^bDMS = diferença mínima significativa (desdobramento de glifosato dentro de cada nível de 2,4-D).

^cDMS = diferença mínima significativa (desdobramento de 2,4-D dentro de cada nível de glifosato).

^dCV = coeficiente de variação.

A maior translocação foi observada no tratamento isolado de glifosato a 720 g e.a ha⁻¹, atingindo 5.33% entretanto, a adição do 2,4-D a esse tratamento reduziu a translocação de forma significativa em todas as doses, onde a translocação variou de 1.19 a 1.77%, redução de 77.67% frente a aplicação do glifosato isolado. Esses resultados indicam que o antagonismo observado no controle de *S. verticillata*, através da associação de 2,4-D com glifosato a 720 g e.a ha⁻¹, esta associada com a translocação, pois reduz a quantidade de glifosato que é translocada até o sítio de ação, reduzindo dessa forma os efeitos de controle do produto utilizado de forma isolada. Outro aspecto, relevante é que o aumento da dose de glifosato, de 720 para 1440 g e.a ha⁻¹, funciona como uma forma de mitigar o efeito antagonístico com a mistura de 2,4-D, pois apresentou a mesma translocação quando utilizado de forma isolada, sugerindo que quando necessária a associação, essa deve ser adota com maiores doses de glifosato.

Comparando os dois níveis do fator glifosato, houve diferença significativa apenas quando aplicados isolados, onde a dose de 720 g e.a ha⁻¹ proporcionou maior percentual de translocação do herbicida do que a dose de 1440 g e.a ha⁻¹ de glifosato, enquanto a partir do momento em que foram associados aos diferentes níveis de 2,4-D o percentual de glifosato translocado foi considerado estatisticamente igual. Ou seja, a associação ao 2,4-D não influenciou a translocação da maior dose de glifosato, mas por reduzir a translocação da dose de 720 g e.a ha⁻¹, tornou os tratamentos estatisticamente iguais.

Os dados apresentados na tabela 8, reforçam o baixo percentual de translocação do glifosato na planta daninha *S. verticillata*, pois independente da dose de glifosato e/ou da sua associação com 2,4-D, o percentual translocado foi menor ou igual a 5%. Esses resultados corroboram com os obtidos por (Fadin et al. 2018), os quais obtiveram baixa translocação de glifosato em *S. verticillata*, principalmente no estágio de desenvolvimento de 4 a 6 folhas verdadeiras, onde a média foi de 10%, sendo inferior aquela encontrada nos estádios de 2 a 4

folhas e reprodutivo, os autores indicam que a translocação varia entre as espécies de plantas devido às diferenças em seu metabolismo causadas por alterações fisiológicas ou anatômicas, e que no caso específico de *S. verticillata*, enquanto o herbicida não atingir as reservas subterrâneas, as plantas podem rebrotar, sobrevivendo à aplicação de glifosato.

A redução na absorção e translocação de glifosato para as raízes devido a associação com herbicidas mimetizadores da auxina, já havia sido relatada por Flint e Barrett (1989), onde os autores associaram os herbicidas 2,4-D e dicamba ao glifosato para verificar a eficácia sobre *Sorghum halepense*, no trabalho houve redução significativa dos dois parâmetros para diferentes doses testadas, mas assim como observado no presente trabalho, conforme os autores aumentaram a dose de glifosato associado ao 2,4-D ou dicamba a redução na eficácia de controle foi menor, indicando que o aumento da dose de glifosato pode ser uma estratégia para o uso das duas moléculas associadas.

Diferenças entre espécies de plantas daninhas, podem apresentar comportamento distinto entre as duas moléculas herbicidas, segundo (Palma-Bautista et al. 2021), verificando a absorção e translocação de glifosato quando aplicado isolado ou associado ao 2,4-D sobre biótipos resistentes e suscetíveis de *Conyza canadensis* e tolerantes e não tolerantes de *Epilobium ciliatum* verificaram maior absorção e translocação do ^{14}C glifosato quando associado ao 2,4-D, havendo diferenças apenas entre os biótipos. Enquanto outros autores como (Ou et al. 2018), trabalhando com biótipos suscetíveis e resistentes a glifosato e dicamba de *Kochia scoparia* verificaram que a translocação de ambos herbicidas, glifosato e dicamba, foi reduzida quando aplicados associados sobre biótipos resistentes, resultando em controle inferior frente a aplicação de glifosato isolado.

Uma possível justificativa, consiste em que as auxinas sintéticas desencadeiam reações metabólicas e fisiológicas reduzindo rapidamente a transpiração e assimilação de carbono e induzindo um crescimento anormal (Grossmann 2010), o que acaba afetando a translocação do glifosato após determinado período de tempo.

A figura 14 ilustra o percentual de glifosato translocados após aplicação dos tratamentos do presente trabalho. Em relação a menor translocação do glifosato na dose de 720 g e.a ha⁻¹, independentemente da dose de 2,4-D, pode ser justificada pela menor porcentagem de glifosato que foi absorvida e conseqüentemente, menor porcentagem que ficou disponível para translocação. Dessa forma a redução na absorção de glifosato na associação resultou em decréscimo na translocação o que pode resultar em antagonismo no controle de *S. verticillata*.

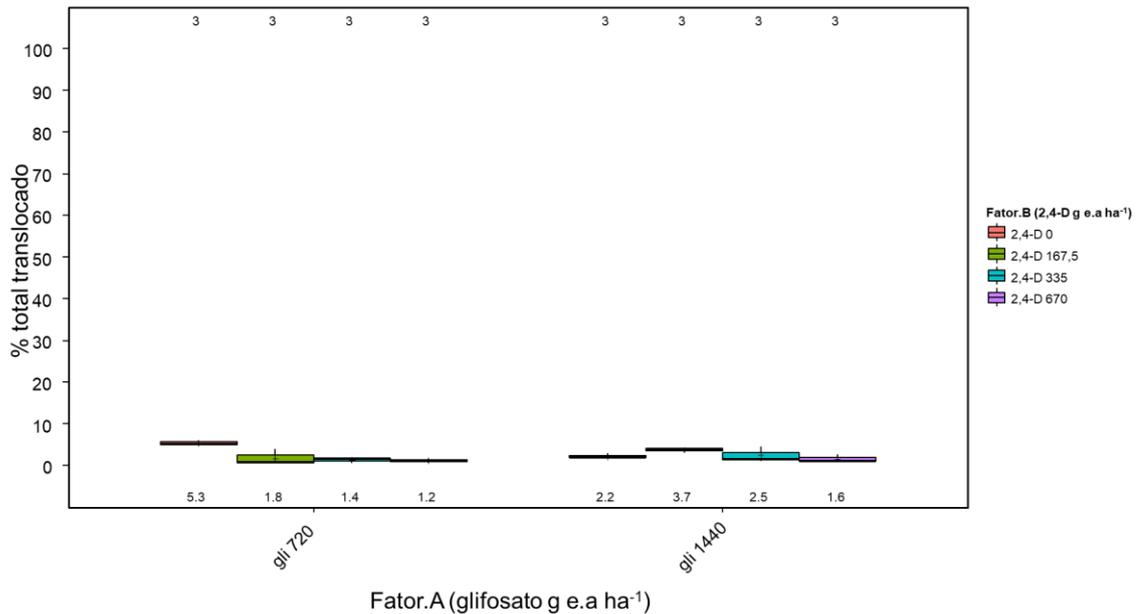


Figura 14. Percentual total translocado às 72 horas após aplicação dos tratamentos contendo glifosato radiomarcado sobre as plantas de *S. verticillata*. Os números abaixo de cada boxplot indicam a média e o valor acima o número de repetições.

(Li et al. 2020), estudando o efeito da interação entre glifosato e 2,4-D sobre biótipos de *Echinochloa colona* (L.) resistentes e suscetíveis a glifosato verificaram que a absorção de glifosato pela folha atingiu até 80% dentro de 24 horas sem aumento adicional ao longo de 48 a 72 horas, e 45% de glifosato foi translocado para as folhas não tratadas e o caule. No entanto, quando aplicado com 2,4-D, a absorção de glifosato foi significativamente reduzida, em até 20%. Para 48 e 72 horas após o tratamento, a translocação de glifosato para folhas não tratadas e o caule foi reduzido em até 12% e foi significativamente menor na presença de 2,4-D do que na ausência de 2,4-D, dessa forma os autores constataram que, é provável que o 2,4-D antagoniza o glifosato em *Echinochloa colona* resistente ao glifosato devido à redução da absorção e translocação de glifosato.

Portanto a análise do balanço de massa do Experimento 1, resultou em interação significativa entre os fatores dose de glifosato e dose de 2,4-D para os três parâmetros estudados, percentual total não absorvido, absorvido e translocado de glifosato nas plantas de *S. verticillata*. O tratamento de glifosato a 720 g e.a ha⁻¹ sofreu maior influência das associações com 2,4-D, o que resultou em menor absorção e translocação quando comparado ao produto isolado, enquanto a dose de 1440 g e.a ha⁻¹ de glifosato apresentou menor influência em relação a presença e doses de 2,4-D, sendo impactado em apenas um dos parâmetros quando associado a 167,5 g e.a ha⁻¹ de 2,4-D.

A planta daninha *S. verticillata* mostrou suscetibilidade ao glifosato e tolerância ao 2,4-D, assim a redução observada na absorção e translocação de glifosato quando associado ao 2,4-D,

especialmente na dose de 720 g e.a ha⁻¹, constitui um fator fundamental no baixo controle de *S. verticillata* quando a associação entre glifosato e 2,4-D é efetuada nessas doses. Dessa forma, com base nos resultados obtidos pelos diversos autores e com os resultados obtidos nesse experimento, podemos afirmar que o antagonismo relatado na associação de glifosato + 2,4-D no controle de *S. verticillata*, está associado a menor absorção e translocação de glifosato, que ocorreu de forma significativa para a dose de 720 g e.a ha⁻¹.

Em continuidade ao processo de quantificação do ¹⁴C glifosato nas plantas de *S. verticillata*, o procedimento de oxidação das partes das plantas em folhas tratadas, folhas acima e folhas abaixo das folhas tratadas, caule e raiz, resultou nos dados médios apresentados na tabela 9 para o Experimento 1 (¹⁴C glifosato). É possível observar que para o herbicida glifosato independente da dose, a translocação ocorre predominantemente para o sistema radicular, pois dentre os percentuais o maior foi encontrado na raiz com 3.29 e 1.11% para as doses de 720 e 1440 g e.a ha⁻¹ de glifosato respectivamente. Esse comportamento se repetiu para associação de glifosato com 2,4-D independente da dose.

Tabela 9. Percentual médio da radioatividade total aplicada sobre as plantas de *S. verticillata* distribuída entre as partes das plantas após oxidação no Experimento 1.

Fator A Glifosato (g e.a ha ^{-1a})	Fator B 2,4-D (g e.a ha ⁻¹)	Percentual (%)				
		Folhas tratadas	Folhas acima	Folhas abaixo	Caule	Raiz
720	0	28.27	0.81	0.57	0.65	3.29
1440	0	13.11	0.32	0.24	0.47	1.11
720	167,5	7.92	0.16	0.23	0.38	0.99
720	335	7.34	0.13	0.11	0.46	0.65
720	670	9.99	0.16	0.09	0.47	0.45
1440	167,5	14.43	0.3	0.35	1.58	1.47
1440	335	13.84	0.23	0.39	0.57	1.27
1440	670	12.3	0.09	0.09	0.28	1.13

^ag e.a ha⁻¹ = gramas de equivalente ácido por hectare.

Os resultados identificam uma tendência de acumulação no sistema radicular do herbicida glifosato, independentemente da dose, representando uma translocação acropetal. Essa translocação do glifosato para o sistema radicular, está relacionado ao transporte de açúcares no floema (Taiz et al. 2015). Outros autores obtiveram resultado semelhante como (Fadin et al. 2018), os quais estudando a translocação de glifosato em *S. verticillata*, observaram que uma parte da translocação de glifosato foi acropetal, com uma translocação média de 67%. Um segundo ponto de destaque é a inibição da translocação do glifosato para a raiz, na associação com 2,4-D, sendo esse comportamento mais expressivo na dose de 720 g e.a ha⁻¹ e menos expressivo para

1440 g e.a ha⁻¹, ou seja, o aumento de glifosato resultou em compensação na inibição da translocação para raiz, mas não anulou o efeito negativo.

A translocação de glifosato em *S. verticillata*, pode ser visualizada na figura 15, onde estão representadas as autoradiografias das plantas às 72 HAA, sempre ao lado de uma foto da mesma planta com o respectivo tratamento, essas informações colaboram para a interpretação dos resultados quantificados inerentes a translocação do produto. Os gráficos a direita de cada planta contém o percentual da radioatividade presente em cada parte da planta (FT – folhas tratadas; FAC – folhas acima das folhas tratadas; FAB – folhas abaixo das folhas tratadas; caule e raiz) em relação ao percentual médio total absorvido em cada tratamento.

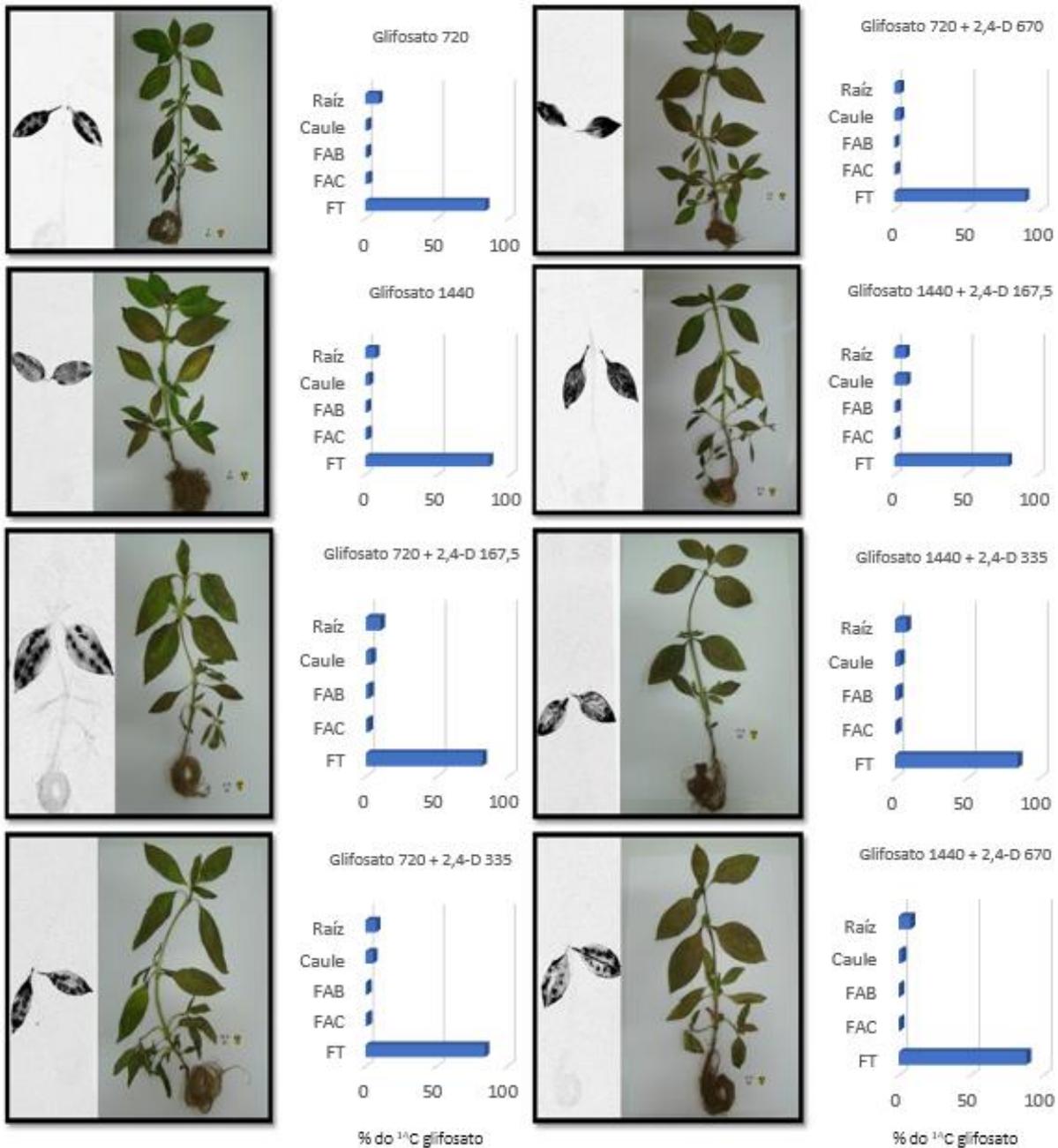


Figura 15. Autoradiografias e respectivas fotos de uma repetição de cada tratamento às 72 horas após aplicação dos tratamentos contendo ^{14}C glifosato. Os gráficos a direita de cada figura contém o percentual da radioatividade presente nas diferentes partes da planta, em relação ao total absorvido em cada tratamento. (FT – folhas tratadas; FAC – folhas acima das tratadas; FAB – folhas abaixo das tratadas).

Através da observação das imagens e gráficos, fica claro a tendência do ingrediente ativo glifosato permanecer retido na folha tratada após aplicação sobre *S. verticillata*, isolado ou aplicado associado ao 2,4-D, o que sugere a importância de uma boa cobertura da planta durante a aplicação, para se obter o melhor resultado possível. A maior retenção na folha tratada pode estar relacionada a características inerentes a espécie de planta daninha, pois outros autores obtiveram resultados semelhantes para diferentes espécies como *C. canadensis*, *E. ciliatum*, *K. scoparia*, *A.*

hybridus, *I. grandifolia*, *C. benghalensis* (Monquero et al. 2004, Ou et al. 2018, Palma-Bautista et al. 2021).

3.2. Absorção foliar e translocação de 2,4-D radiomarcado em *S. verticillata*

Os valores médios obtidos para os parâmetros avaliados envolvendo o ^{14}C 2,4-D, percentual não absorvido, absorvido e translocado pelas plantas de *S. verticillata* às 72 horas após aplicação, podem ser observados na tabela 10, dados referente ao balanço de massa dos diferentes tratamentos.

Tabela 10. Balanço de massa proporcionado pelos diferentes tratamentos herbicidas. Valores indicam o percentual médio de ^{14}C 2,4-D não absorvido, absorvido e translocado pelas plantas de *S. verticillata* às 72 horas após aplicação dos tratamentos.

Fator A Glifosato (g e.a ha ^{-1a})	Fator B 2,4-D (g e.a ha ⁻¹)	Percentual (%)		
		Não Absorvido	Absorvido	Translocado
0	167,5	61.33	20.46	14.38
0	335	57.00	24.06	16.18
0	670	60.05	27.26	17.66
720	167,5	9.24	47.66	32.57
720	335	6.44	62.07	28.74
720	670	10.03	62.47	24.20
1440	167,5	5.81	58.64	35.31
1440	335	4.98	57.65	33.76
1440	670	7.19	51.43	9.81

^ag e.a ha⁻¹ = gramas de equivalente ácido por hectare.

Para o percentual do ^{14}C 2,4-D não absorvido, através da análise de variância ao nível de 95% de significância, não houve efeito significativo da interação entre os fatores glifosato e 2,4-D (p valor = 0.9920), assim, como a interação foi não significativa os fatores podem ser avaliados independentemente.

O fator 2,4-D não foi significativo (p valor = 0.5911), mas o fator glifosato apresentou elevada significância (p valor = 0.0000), na presença do glifosato a não absorção de 2,4-D reduziu drasticamente (Tabela 11). Nesse sentido, podemos observar que na ausência do glifosato, os tratamentos com 2,4-D tiveram uma taxa de não absorção média de 59.46%, em contapartida na associação de 2,4-D e glifosato, o percentual máximo do ingrediente ativo não absorvido foi de 8.57%. Dessa forma, os tratamentos isolados de 2,4-D apresentaram percentual não absorvido

superior quando comparado aos tratamentos que receberam associação ao glifosato, assim, todos os tratamentos de 2,4-D com glifosato diferiram estatisticamente daqueles com 2,4-D isolado, demonstrando que a associação com glifosato reduziu a não absorção de 2,4-D. Ou seja, o percentual de 2,4-D não absorvido é significativamente superior na ausência de glifosato, independente da dose de glifosato ou 2,4-D adotada.

Tabela 11. Percentual médio de 2,4-D não absorvido às 72 horas após aplicação dos tratamentos em função do fator glifosato.

Fator A glifosato (g e.a ha ^{-1a})	¹⁴ C 2,4-D não absorvido (%)	
	72 horas após aplicação	
0	59.46	b
720	8.57	a
1440	5.99	a

médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna são consideradas iguais através do teste de Tukey (p<0.05)
DMS^b 13.92
CV^c(%) 26.77

^ag e.a ha⁻¹ = gramas de equivalente ácido por hectare.

^bDMS = diferença mínima significativa; ^cCV = coeficiente de variação.

Para o percentual do ¹⁴C 2,4-D absorvido, através da análise de variância ao nível de 95% de significância, não houve efeito significativo da interação glifosato e 2,4-D (p valor = 0.2643), assim, como a interação foi não significativa os fatores podem ser avaliados independentemente. O fator 2,4-D não foi significativo (p valor = 0.3393), mas o fator glifosato apresentou elevada significância (p valor = 0.0000). A presença do glifosato resultou em maior absorção de 2,4-D, resultando em média de 57.4 e 55.91% para as doses de 720 e 1440 g.e.a.ha⁻¹ de glifosato respectivamente (Tabela 12), resultando em diferença estatística significativa em relação aos tratamentos compostos por 2,4-D isolado, onde a média foi de 23.93%.

Tabela 12. Percentual médio de 2,4-D absorvido às 72 horas após aplicação dos tratamentos em função do fator glifosato.

Fator A glifosato (g e.a ha ^{-1a})	¹⁴ C 2,4-D absorvido (%)	
	72 horas após aplicação	
0	23.93	b
720	57.40	a
1440	55.91	a

médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna são consideradas iguais através do teste de Tukey (p<0.05)
DMS^b 17.96
CV^c(%) 18.63

^ag e.a ha⁻¹ = gramas de equivalente ácido por hectare.

^bDMS = diferença mínima significativa; ^cCV = coeficiente de variação.

A absorção de 2,4-D foi maior na presença de glifosato, aproximadamente 2.3 vezes superior, não havendo diferença significativa entre as doses de glifosato associadas, enquanto o fator 2,4-D não exerceu influência sobre a absorção. Na análise da figura 16, é possível observar a diferença no patamar dos boxplots constituídos pelos tratamentos de 2,4-D sem glifosato e aqueles envolvendo a associação entre os dois ingredientes ativos.

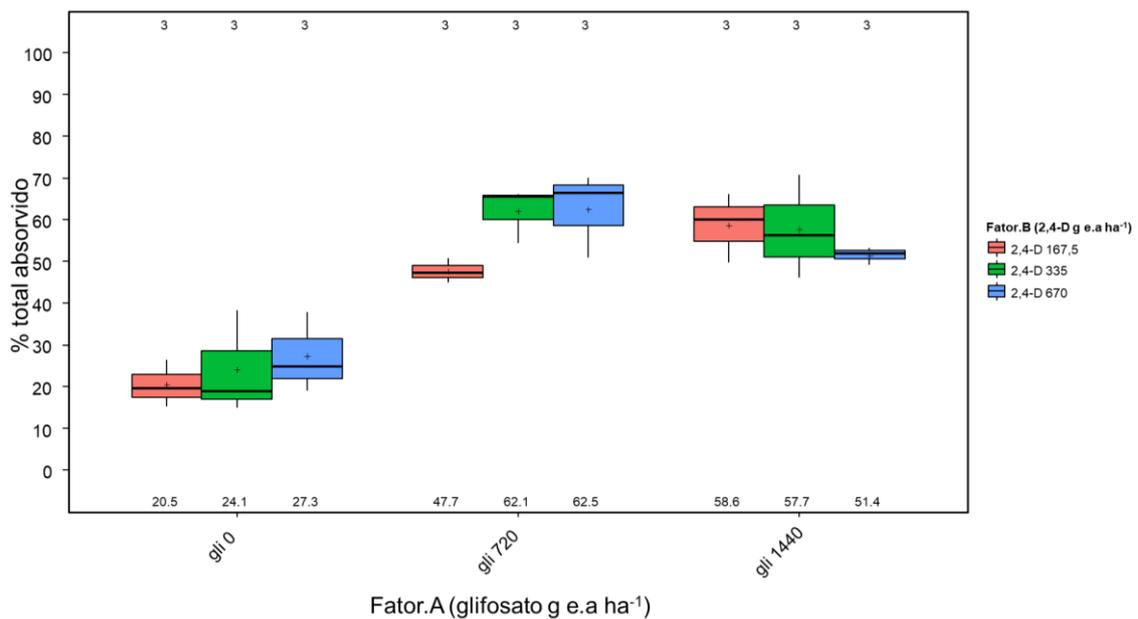


Figura 16. Percentual total absorvido às 72 horas após aplicação dos tratamentos contendo ¹⁴C 2,4-D sobre as plantas de *S. verticillata*. Os números abaixo de cada boxplot indicam a média e o valor acima o número de repetições.

Para o percentual do ¹⁴C 2,4-D translocado, através da análise de variância ao nível de 90% de significância, houve efeito significativo da interação glifosato e 2,4-D (p valor = 0.0735), assim, como a interação foi significativa deve-se desdobrar os resultados obtidos em níveis do fator glifosato dentro de cada nível do fator 2,4-D e dos níveis de 2,4-D dentro de cada nível de glifosato (Tabela 13).

Tabela 13. Percentual médio de 2,4-D translocado às 72 horas após aplicação dos tratamentos.

Fator A glifosato (g e.a ha ^{-1a})	Fator B 2,4-D (g e.a ha ⁻¹)								
	167.5		335		670				
0	14.38	b	A	16.19	a	A	17.66	a	A
720	32.58	ab	A	28.74	a	A	24.2	a	A
1440	35.31	a	A	33.76	a	A	9.81	a	B

médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha são consideradas iguais através do teste de Tukey (p<0.10)
DMS^b 18.26
CV^c(%) 36.66

^ag e.a ha⁻¹ = gramas de equivalente ácido por hectare.

^bDMS = diferença mínima significativa; ^cCV = coeficiente de variação.

A translocação de 2,4-D na menor dose adotada (167.5 g e.a ha⁻¹), foi maior na associação com 1440 g e.a ha⁻¹ de glifosato, diferindo estatisticamente quando aplicado isolado e se equiparando com a dose de 720 g e.a ha⁻¹, porém para as demais doses de 2,4-D não houve diferença quando associadas ou não ao glifosato, diferentemente do observado para os parâmetros absorção e não absorção de 2,4-D. O percentual de 2,4-D translocado nas plantas de *S. verticillata* foi superior aquele observado para o glifosato, aplicado isolado a translocação de 2,4-D atingiu o máximo de 17.66% como pode ser observado na figura 17, enquanto o glifosato isolado obteve máximo de 5.33%, ou seja, 3.3 vezes inferior.

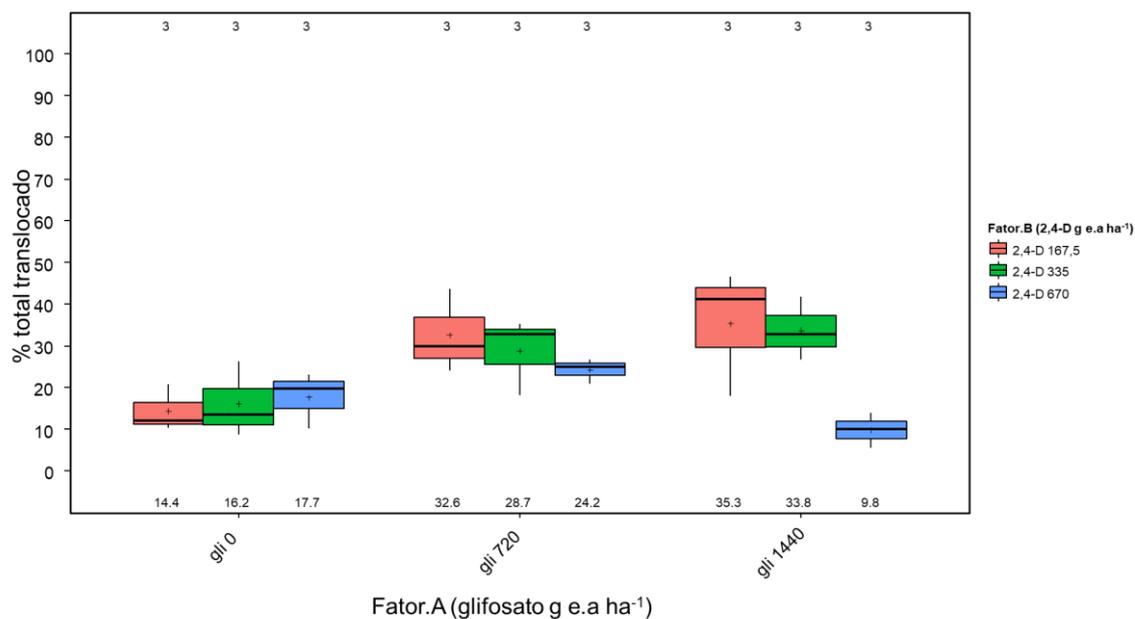


Figura 17. Percentual total translocado às 72 horas após aplicação dos tratamentos contendo 2,4-D radiomarcado sobre as plantas de *S. verticillata*. Os números abaixo de cada boxplot indicam a média e o valor acima o número de repetições.

Portanto a análise do balanço de massa do Experimento 2, resultou em interação significativa entre os fatores dose de glifosato e dose de 2,4-D apenas para o parâmetro percentual total translocado. Em relação aos parâmetros percentual total não absorvido e absorvido não houve através da ANOVA interação significativa entre os fatores, porém para os dois parâmetros citados o fator glifosato apresentou elevada significância, ou seja, na presença do glifosato a 720 e 1440 g e.a ha⁻¹ houve redução do percentual não absorvido e aumento do percentual absorvido de 2,4-D.

Dessa forma, diante dos resultados obtidos é possível correlacionar que o maior impacto em relação ao comportamento na planta do 2,4-D quando associado com o glifosato, esta relacionado a absorção. Esses resultados corroboram com (Lym 2000), que constatou incremento da absorção de 2,4-D em torno de 3 vezes quando o produto foi associado ao glifosato em dois estádios de desenvolvimento distintos de *Euphorbia esula* as 72 HAA. Os autores também observaram que o aumento da absorção de 2,4-D resultou em mais herbicida translocado para todas as folhas e partes da planta, assim como observado no presente trabalho.

A ausência de diferença significativa em relação a translocação do 2,4-D, pode estar associada a existência de dois tipos de receptores químicos que detectam a presença de auxina sintética em vegetais (Kelley e Riechers 2007). Um deles seria ABP1 (Auxin Binding Protein 1), uma proteína encontrado no retículo endoplasmático e na membrana plasmática que codifica um sinal indutor superatividade nas bombas de prótons na membrana. O outro grupo de receptores de auxina descoberto mais recentemente são as proteínas F-Box: TIR1 (transporte resposta do inibidor) / AFB (caixa-F de sinalização de auxina). Essas proteínas fazem parte da ubiquitina SCF complexo ligase (proteína Skp1-cullin-F-box), que realiza a ubiquitinação de algum alvo proteínas, degradando-as através do proteossoma da ubiquitina (Dharmasiri et al. 2005, Gleason et al. 2011). Dessa forma no núcleo das células vegetais existem ARFs (fatores de resposta de auxina), genes que são ativados apenas com a presença de auxinas. A ativação desses genes induz ACC (1-Aminociclopropano-1-ácido carboxílico) sintase, que eleva a concentração de ACC, um etilenoprecursor, os quais podem resultar em maior ou menor translocação em virtude do receptor químico.

Nesse sentido a maior absorção de 2,4-D não resulta necessariamente em maior porcentagem de translocação, e conseqüentemente em maior porcentagem de controle de plantas daninhas. Isso ocorre, pois além do comportamento do herbicida na planta, as porcentagens de controle estão associadas a suscetibilidade da planta daninha ao herbicida, dessa forma se a espécie em questão, não é eficientemente controlada pelo herbicida 2,4-D não será observado

incremento de controle. Nesse caso a planta daninha *S. verticillata* mostrou ser tolerante ao 2,4-D, assim o maior percentual de absorção e translocação do 2,4-D na presença do glifosato não é um fator determinante para o controle dessa planta daninha. Em continuidade ao processo de quantificação do ^{14}C 2,4-D nas plantas de *S. verticillata*, o procedimento de oxidação das partes das plantas em folhas tratadas, folhas acima e folhas abaixo das folhas tratadas, caule e raiz resultou nos dados médios apresentados na tabela 14 para o Experimento 2.

Tabela 14. Percentual médio da radioatividade total aplicada sobre as plantas de *S. verticillata* distribuída entre as partes das plantas após oxidação no Experimento 2.

Fator A Glifosato (g e.a ha ^{-1a})	Fator B 2,4-D (g e.a ha ⁻¹)	Percentual (%)				
		Folhas tratadas	Folhas acima	Folhas abaixo	Caule	Raiz
0	167,5	6.07	0.33	0.02	10.52	3.5
0	335	7.87	3.31	0.24	10.5	2.12
0	670	9.6	4.2	0.75	9.93	2.77
720	167,5	11.41	6.69	1.3	13.39	5.52
720	335	33.33	10.91	1.74	12.92	3.16
720	670	38.26	6.39	1.2	14.72	1.88
1440	167,5	23.33	16.19	0.82	13.85	4.44
1440	335	23.89	17.32	1.06	10.84	4.54
1440	670	41.62	1.78	1.31	5.42	1.29

^ag e.a ha⁻¹ = gramas de equivalente ácido por hectare.

Analisando os dados é possível observar que na aplicação dos níveis do fator 2,4-D de forma isolada, houve retenção nas folhas tratadas com valores de 6,07; 7,87 e 9,60% para as respectivas doses de 167,5; 335 e 670 g e.a ha⁻¹, no entanto a translocação foi mais expressiva do que a retenção foliar, sendo o maior percentual encontrado no caule, com 10.52, 10.50 e 9,93%, para os tratamentos nas doses de 167,5; 335 e 670 g e.a ha⁻¹, respectivamente.

Em relação a associação de 2,4-D com glifosato, é possível observar o maior percentual de 2,4-D presente nas folhas tratadas, independente da dose de glifosato ou 2,4-D, mas mesmo assim a translocação para outras partes da planta é significativa, principalmente para o caule, folhas acima daquelas tratadas e raízes, indicando elevada mobilidade deste ativo em *S. verticillata*. Os valores obtidos são maiores devido a maior absorção de 2,4-D promovida pela presença do glifosato, comparativamente aos tratamentos isolados de 2,4-D.

Segundo (Lym 2000), a maior translocação de 2,4-D na associação com glifosato, pode estar associada a continuidade do crescimento vegetativo na planta daninha, que resulta em aumento da translocação basípeta (translocação pelo floema no sentido folha – raiz) de 2,4-D.

Esse resultado corrobora com os dados obtidos nesse experimento, onde a translocação do 2,4-D foi do tipo basipeta, e essa aumentou de forma significativa na associação com glifosato.

A translocação de 2,4-D em *S. verticillata*, pode ser visualizada na figura 18, onde estão representadas as autoradiografias das plantas às 72 HAA, sempre ao lado de uma foto da mesma planta com o respectivo tratamento, essas informações colaboram para a interpretação dos resultados quantificados inerentes a translocação do produto. Os gráficos a direita de cada planta contém o percentual da radioatividade presente em cada parte da planta (FT – folhas tratadas; FAC – folhas acima das folhas tratadas; FAB – folhas abaixo das folhas tratadas; caule e raiz) em relação ao percentual médio total absorvido em cada tratamento.

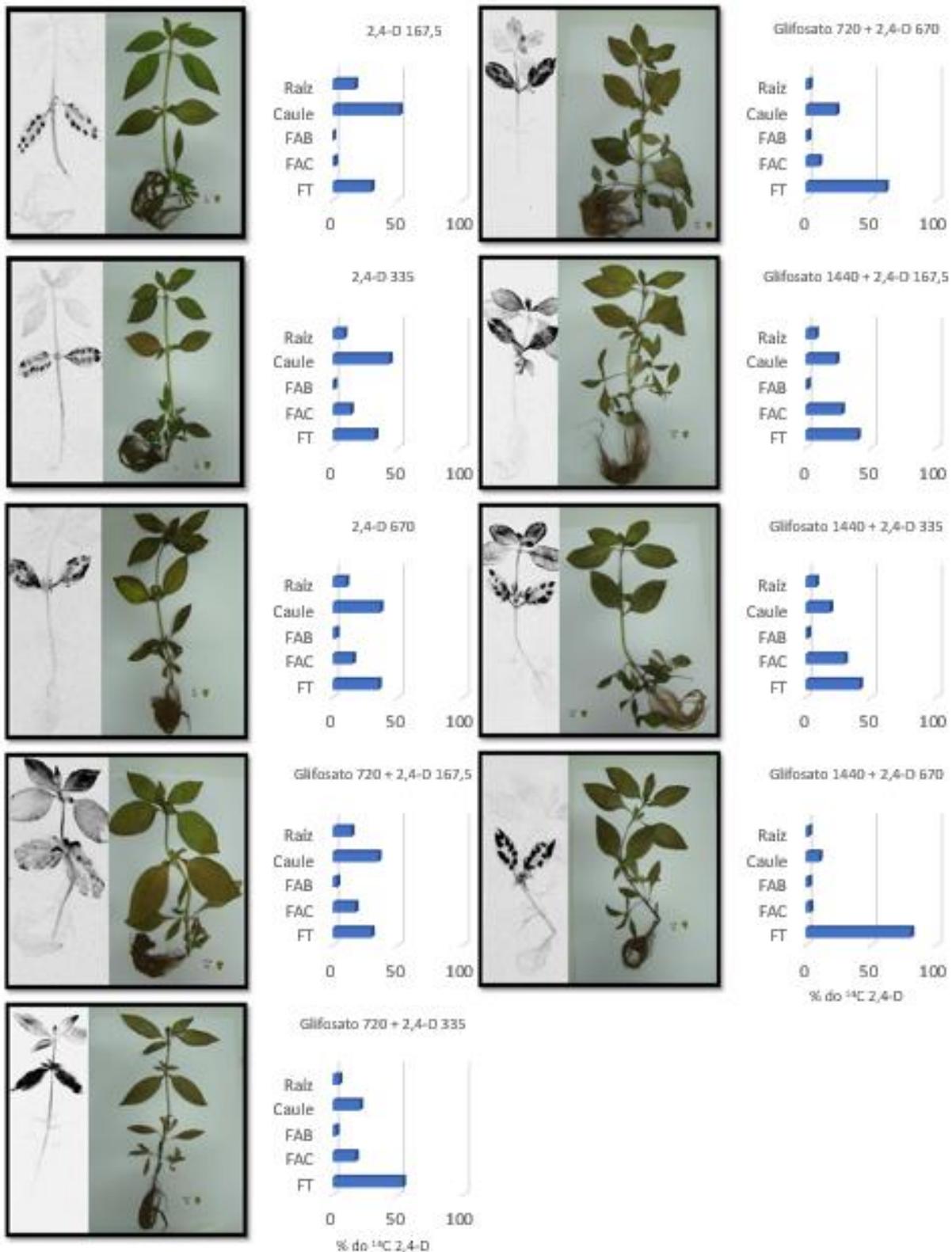


Figura 18. Autoradiografias e respectivas fotos de uma repetição de cada tratamento às 72 horas após aplicação dos produtos radiomarcados no experimento 2. Os gráficos a direita de cada figura contém o percentual da radioatividade presente nas diferentes partes da planta, em relação ao total absorvido em cada tratamento. (FT – folhas tratadas; FAC – folhas acima das tratadas; FAB – folhas abaixo das tratadas).

Os tratamentos compostos por 2,4-D isolado, nas doses de 167,5; 335 e 670 g e.a ha⁻¹ apresentaram comportamento distinto ao do glifosato isolado, apresentando distribuição mais uniforme entre as folhas tratadas, folhas acima, caule e raiz, quando associado ao glifosato a distribuição permaneceu semelhante, mas com maior intensidade devido a maior absorção de 2,4-D promovida pela presença do glifosato, como pode ser observado nas autoradiografias apresentadas na figura 18.

3.3. Resposta da planta daninha *S. verticillata* a diferentes doses de glifosato e 2,4-D isoladas e associadas

De acordo com a análise de variância ao nível de 95% de significância houve interação significativa entre os fatores glifosato e 2,4-D no controle da planta daninha *S. verticillata* para todos os períodos de avaliação aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação (DAA) dos tratamentos herbicidas. As avaliações visuais de porcentagem de controle aos 7 DAA podem ser visualizados na Tabela 15.

Tabela 15. Desdobramento dos níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em relação a porcentagem visual de controle de *S. verticillata* aos 7 DAA.

Fator A Glifosato (g e.a ha ^{-1a})	Fator B 2,4-D (g e.a ha ⁻¹)											
	0.00		83.75		167.5		335.0		670.0		1340.0	
0.0	0.00	c B	10.00	c B	22.50	b B	40.00	b A	42.50	b A	50.00	a A
180.0	8.75	c B	32.50	c A	17.50	b B	23.75	b B	43.75	b A	50.00	a A
360.0	17.50	c B	23.75	c B	28.75	b B	51.25	a A	41.25	b A	38.75	a A
720.0	71.25	a A	47.50	b B	33.75	b B	38.75	b B	38.75	b B	52.50	a B
1440.0	40.00	b A	50.00	b A	43.75	b A	55.00	a A	52.50	b A	66.25	a A
2880.0	71.25	a A	73.75	a A	77.50	a A	71.25	a A	68.75	a A	56.25	a A

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas são consideradas iguais através do teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

P valor (interação) <0.05

CV^b 30.29

^ag e.a ha⁻¹ = gramas de equivalente ácido por hectare.

^bCV = coeficiente de variação.

Aos 7 DAA os tratamentos com glifosato isolado, nas duas menores doses 180 e 360 g e.a ha⁻¹, apresentaram controle de 8,75 e 17,5% respectivamente e foram considerados estatisticamente iguais entre si e com a testemunha, assim como o 2,4-D nas menores doses 83,75 e 167,5 g e.a ha⁻¹, resultaram em controle de 10 e 22,5% respectivamente, sendo considerados estatisticamente iguais entre si e com a testemunha. As doses de glifosato de 180 e 360 g e.a ha⁻¹ foram beneficiadas pela associação ao 2,4-D, havendo incremento significativo de controle a partir de 670 g e.a ha⁻¹ de 2,4-D para a dose de 180 g e.a ha⁻¹, atingindo controle de 43,75% e de 335 g e.a ha⁻¹ de 2,4-D para a dose de 360 g e.a ha⁻¹, atingindo controle de 51,25% (tabela 15).

A partir da dose de 720 g e.a ha⁻¹ de glifosato, há uma mudança nos resultados, visto que há diferença estatística frente as menores doses e a testemunha, devido a maior eficácia de controle, que por sua vez foi considerada estatisticamente igual ao tratamento com a maior dose de glifosato, atingindo 71.25% de controle. Porém, quando associada a todas as doses de 2,4-D o controle reduziu significativamente, variando de 33.75 a 52.5%. Os maiores níveis de eficácia aos 7 DAA (71.25%) foram proporcionados pelos tratamentos compostos por glifosato isolado nas doses de 720 e 2880 g e.a ha⁻¹, seguidos pelo tratamento de glifosato a 1440 g e.a ha⁻¹.

Para as duas maiores doses de glifosato, 1440 e 2880 g e.a ha⁻¹, a porcentagem visual de controle não apresentou diferença significativa quando aplicado isolado ou associado ao 2,4-D, diferentemente do observado para a dose de 720 g e.a ha⁻¹.

Aos 7 DAA dos tratamentos foi possível observar os sintomas de epinastia nas plantas devido a ação do 2,4-D, bem como necrose das margens das folhas a partir da dose de 670 g e.a ha⁻¹, porém a necrose observada neste experimento sobre *S. verticillata* é diferente daquela relatada por (De Queiroz et al. 2019), onde estudando biótipos de *Conyza sumatrensis*, identificaram um novo mecanismo de resistência ao 2,4-D, através da rápida necrose dos tecidos a partir de 2 horas após aplicação, resultando em controle inferior frente ao biótipo suscetível. Enquanto o glifosato promoveu clorose geral da planta em todas as doses e necrose acentuada para as doses a partir de 720 g e.a ha⁻¹ (Figura 19).

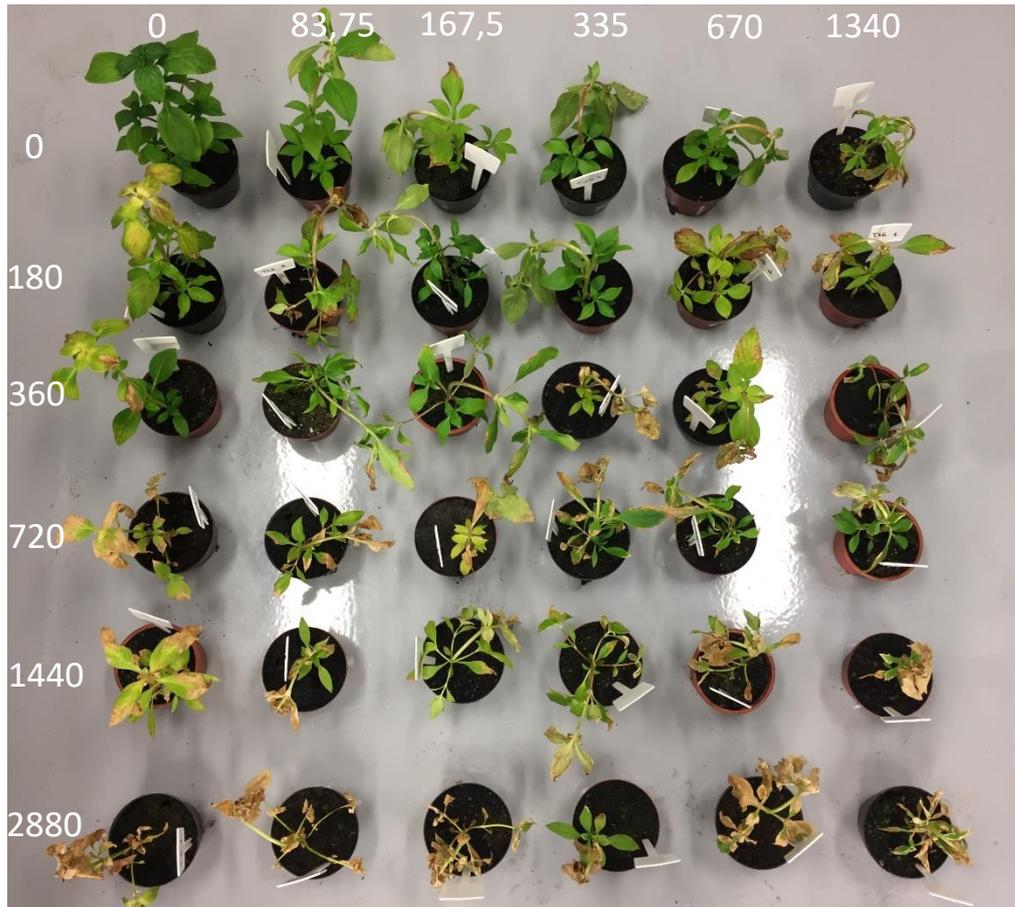


Figura 19. Foto de uma repetição de cada um dos 6 níveis dos fatores glifosato e 2,4-D aos 7 DAA, as linhas representam as doses crescentes de glifosato em g e.a ha⁻¹ (níveis do fator glifosato) e as colunas as doses crescentes de 2,4-D em g e.a ha⁻¹ (níveis do fator 2,4-D) sobre plantas de *Spermocoe verticillata* (vassourinha-de-botão).

Na figura 20 é possível observar a sintomatologia associada ao mecanismo de ação de herbicidas auxínicos, tais como epinastia e crescimento desuniforme, e também indicam uma maior estabilidade e persistência da porcentagem de controle, a qual posteriormente evolui para necrose. Aos 7 DAA, nenhum tratamento apresentou controle efetivo de *S. verticillata*.

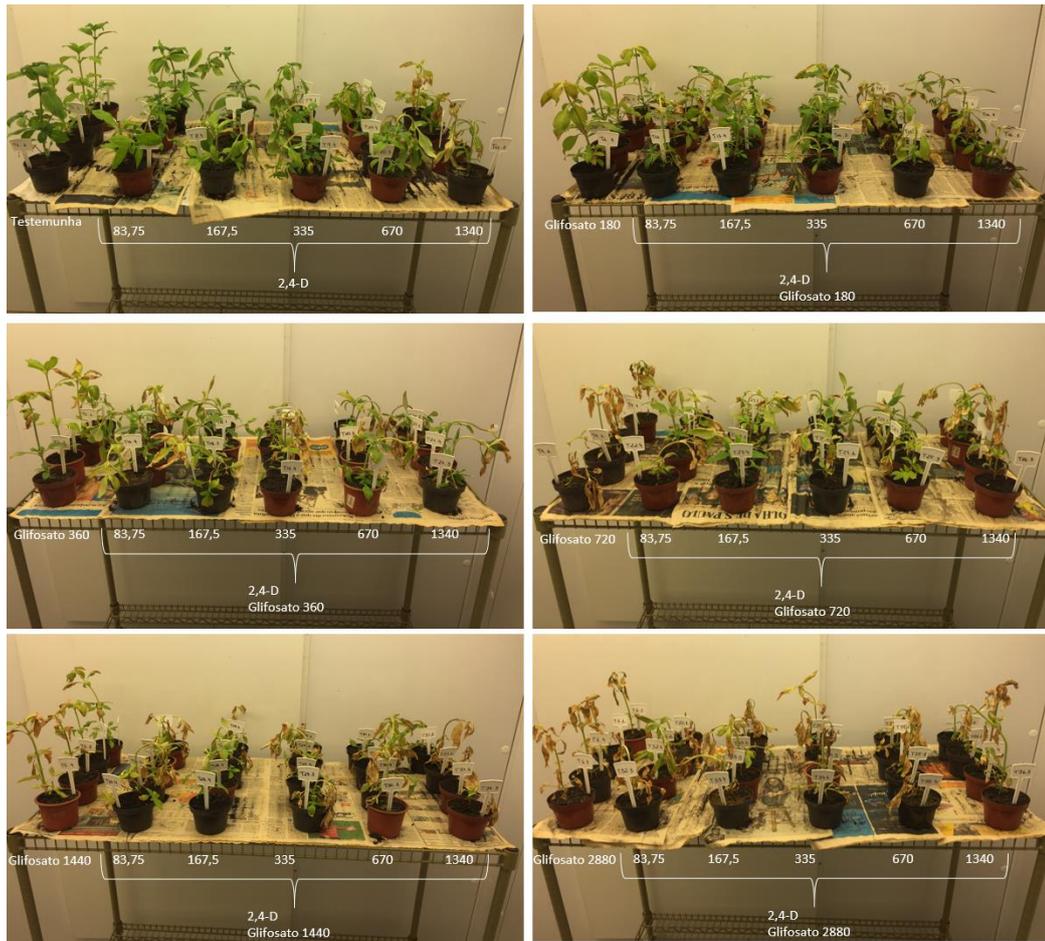


Figura 20. Plantas de *Spermacoe verticillata*, contendo as quatro repetições das 36 interações entre os níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em câmara de crescimento aos 7 DAA, doses de glifosato e 2,4-D expressas em g e.a ha⁻¹.

O glifosato isolado apresentou aos 14 DAA, nas menores doses 180 e 360 g e.a ha⁻¹ controle de 21.25 e 28.75% respectivamente, sendo consideradas estatisticamente iguais e diferentes da testemunha, enquanto as menores doses de 2,4-D diferiram da testemunha, mas foram consideradas iguais às maiores doses, não havendo uma resposta significativa de controle de acordo com o aumento de dose do produto, onde o controle variou de 30 a 56.25% (Tabela 16) diferentemente do observado aos 7 DAA.

Tabela 16. Desdobramento dos níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em relação a porcentagem visual de controle de *S. verticillata* aos 14 DAA.

Fator A Glifosato (g e.a ha ^{-1a})	Fator B 2,4-D (g e.a ha ⁻¹)											
	0.0		83.75		167.5		335.0		670.0		1340.0	
0.0	0.00	c B	36.25	c A	30.00	c A	40.00	c A	44.50	b A	56.25	b A
180.0	21.25	b B	36.25	c A	25.00	c B	36.25	c B	55.00	b A	58.75	b A
360.0	38.75	b B	42.50	c B	56.25	b A	68.75	b A	53.75	b A	47.50	b B
720.0	97.50	a A	80.00	b A	62.50	b B	68.75	b B	61.25	b B	63.75	b B
1440.0	93.75	a A	82.50	b A	77.50	a B	86.25	a A	77.50	a B	80.00	a B
2880.0	99.50	a A	99.50	a A	93.75	a A	92.50	a A	93.25	a A	80.00	a A

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas são consideradas iguais através do teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

P valor (interação) <0.05

CV^b 19.88

^ag e.a ha⁻¹ = gramas de equivalente ácido por hectare.

^bCV = coeficiente de variação.

Aos 14 DAA a partir da dose de 720 g e.a ha⁻¹ a eficácia do glifosato apresentou aumento significativo, atingindo 97.5% de controle, o que permitiu diferenciar este tratamento daqueles com doses menores e ao mesmo tempo equipará-lo aqueles com as doses de 1440 e 2880 g e.a ha⁻¹, resultando nas maiores porcentagens de controle, com 93,75 e 99,5% respectivamente.

Porém, assim como observado na avaliação de 7 DAA, aos 14 DAA a associação do glifosato a 720 g e.a ha⁻¹ com doses de 2,4-D a partir de 167,5 g e.a ha⁻¹ resultaram em redução significativa do percentual de controle, variando de 61.25 a 68.75%. Esse mesmo comportamento não foi observado para as menores doses de glifosato, 180 e 360 g e.a ha⁻¹, onde a associação ao 2,4-D, principalmente a 670 g e.a ha⁻¹, promoveu aumento de controle em comparação as doses isoladas, mesmo assim houve variação na resposta do glifosato conforme associado as diferentes doses de 2,4-D (tabela 16)

Os tratamentos de glifosato isolado nas doses de 720, 1440 e 2880 g e.a ha⁻¹ promoveram as maiores porcentagens de controle de *S. verticillata* aos 14 DAA, para a dose de 2880 g e.a ha⁻¹ a associação ao 2,4-D não influenciou o controle, porém quando aplicado a 1440 g e.a ha⁻¹ houve redução significativa do controle quando associado a 167.5; 670 e 1340 g e.a ha⁻¹ de 2,4-D.

Os sintomas visuais promovidos pelos diferentes tratamentos podem ser observados abaixo, figura 21 e 22, onde a epinastia nas plantas devido a ação do 2,4-D apresenta intensificação frente a avaliação de 7 DAA e aos 14 DAA ocorreu a partir da dose de 167,5 g e.a ha⁻¹, enquanto o glifosato promoveu a necrose total da parte aérea das plantas a partir de 720 g e.a ha⁻¹. A redução da eficácia de controle sobre a dose de glifosato de 720 g e.a ha⁻¹ quando associada com 2,4-D é evidenciada através da observação das partes verdes das plantas, com significância a partir da dose de 167,5 g e.a ha⁻¹.

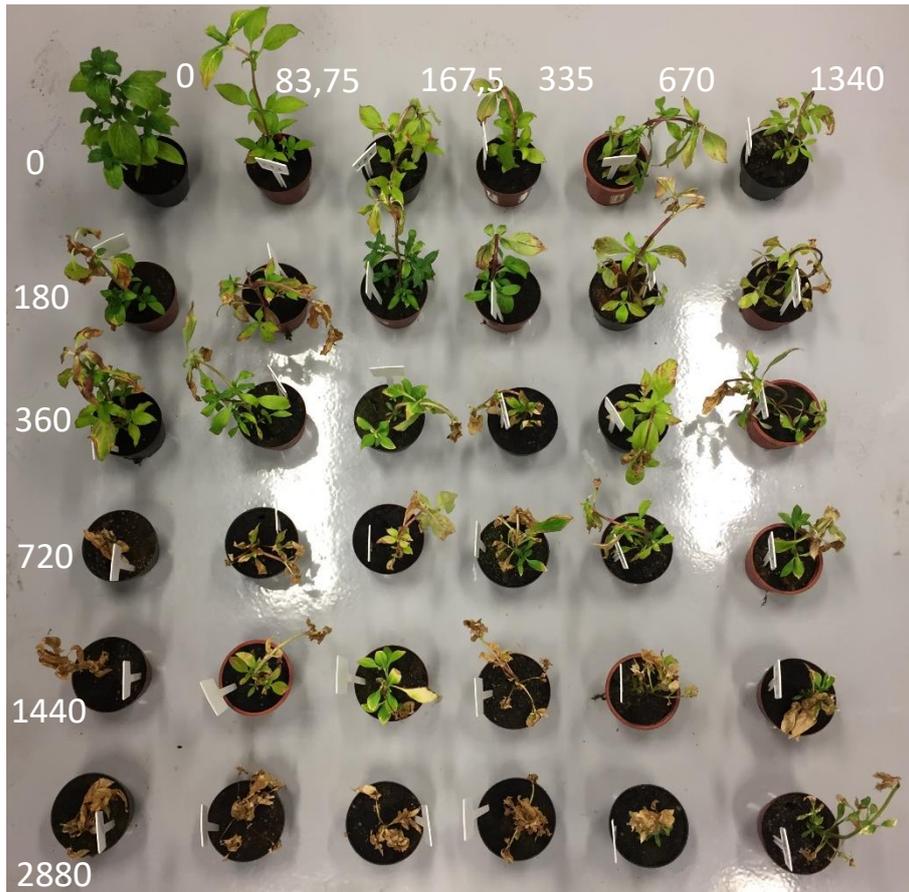


Figura 21. Foto de uma repetição de cada um dos 6 níveis dos fatores glifosato e 2,4-D aos 14 DAA, as linhas representam as doses crescentes de glifosato em g e.a ha⁻¹ (níveis do fator glifosato) e as colunas as doses crescentes de 2,4-D em g e.a ha⁻¹ (níveis do fator 2,4-D) sobre plantas de *Spermacoe verticillata* (vassourinha-de-botão).

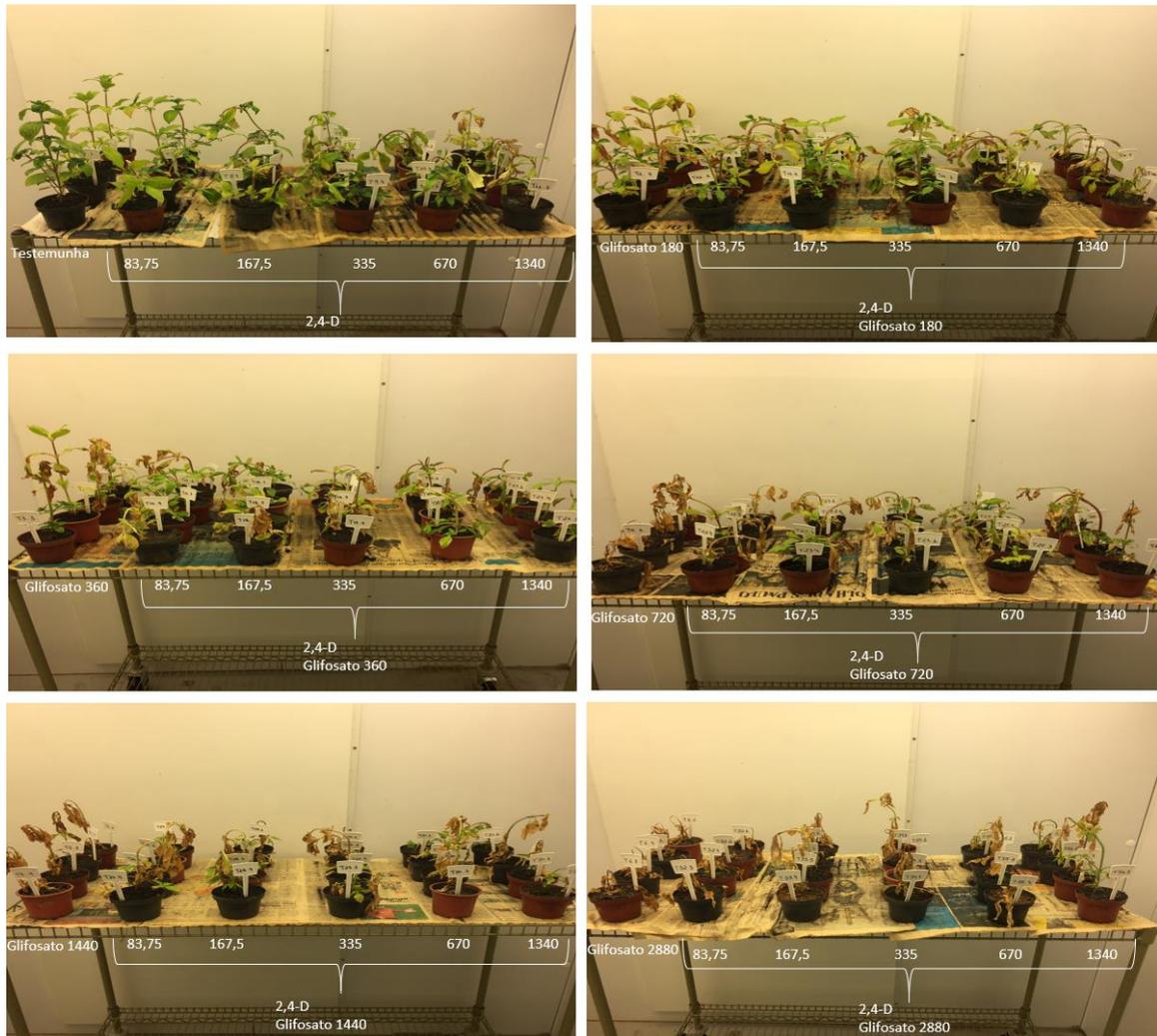


Figura 22. Plantas de *Spermocoe verticillata*, contendo as quatro repetições das 36 interações entre os níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em câmara de crescimento aos 14 DAA, doses de glifosato e 2,4-D expressas em g e.a ha⁻¹.

Aos 21 DAA, pode-se observar na análise da tabela 17, que os tratamentos com aplicação do glifosato isolado nas menores doses, 180 e 360 g e.a ha⁻¹, promoveram controle máximo de 50%, ainda houve incremento de controle com o aumento da dose de 2,4-D associada, principalmente para a dose de glifosato de 180 g e.a ha⁻¹, enquanto para 360 g e.a ha⁻¹ o incremento de controle aconteceu quando associado apenas a 167.5 e 335 g e.a ha⁻¹ de 2,4-D, mesmo assim o controle máximo atingido pelo glifosato a 180 g e.a ha⁻¹ foi de 68.75% associado a 670 g e.a ha⁻¹ de 2,4-D, enquanto o glifosato a 360 g e.a ha⁻¹ associado a 335 g e.a ha⁻¹ de 2,4-D atingiu 72.50% de controle.

Tabela 17. Desdobramento dos níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em relação a porcentagem visual de controle de *S. verticillata* aos 21 DAA.

Fator A Glifosato (g e.a ha ^{-1a})	Fator B 2,4-D (g e.a ha ⁻¹)					
	0.0	83.75	167.5	335.0	670.0	1340.0
0.0	0.00 d C	28.75 e C	53.75 c B	63.75 c A	55.00 c B	65.00 c A
180.0	28.75 c D	46.25 d C	40.00 d C	57.50 c B	68.75 b A	68.75 c A
360.0	50.00 b B	58.75 c B	63.75 c A	72.50 b A	58.75 c B	56.25 d B
720.0	100.00 a A	83.75 b B	76.25 b B	77.50 b B	71.25 b B	76.25 b B
1440.0	93.75 a A	83.75 b A	83.75 b A	92.50 a A	91.25 a A	91.25 a A
2880.0	100.00 a A	100.00 a A	98.75 a A	98.75 a A	96.25 a A	86.25 a B

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas são consideradas iguais através do teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

P valor (interação) <0.05

CV^b 10.47

^ag e.a ha⁻¹ = gramas de equivalente ácido por hectare.

^bCV = coeficiente de variação.

A dose de 720 g e.a ha⁻¹ de glifosato proporcionou controle de 100%, sendo esta considerada estatisticamente igual as duas maiores doses (1440 e 2880 g e.a ha⁻¹ de glifosato), todas proporcionando controle superior a 90% de *S. verticillata*. Porém, assim como observado nas avaliações de 7 e 14 DAA, aos 21 DAA foi possível observar que quando o glifosato na dose de 720 g e.a ha⁻¹ é associado a todas as doses de 2,4-D (83.75; 167.5; 335; 670 e 1340 g e.a ha⁻¹) o controle reduziu significativamente, variando de 71.25 a 83.75%, ou seja, até 28.75% inferior aquele proporcionado pelo glifosato a 720 g e.a ha⁻¹ isolado (tabela 17).

As doses de 1440 e 2880 g e.a ha⁻¹ de glifosato proporcionaram os maiores níveis de controle, junto a dose de 720 g e.a ha⁻¹, mas para as duas maiores doses independente da associação ao 2,4-D o controle foi considerado estatisticamente igual, com exceção da associação de 2880 g e.a ha⁻¹ de glifosato com a maior dose de 2,4-D (1340 g e.a ha⁻¹), que resultou em redução significativa de controle (tabela 17).

A última avaliação realizada aos 21 DAA, resultou em baixa eficácia para os tratamentos compostos por 2,4-D isolados, na dose de 1340 g e.a ha⁻¹, o controle foi de 65%, o que torna possível concluir que *S. verticillata* apresenta tolerância a este ingrediente ativo. Os sintomas visuais promovidos pelos diferentes tratamentos pode ser observado na figura 23.

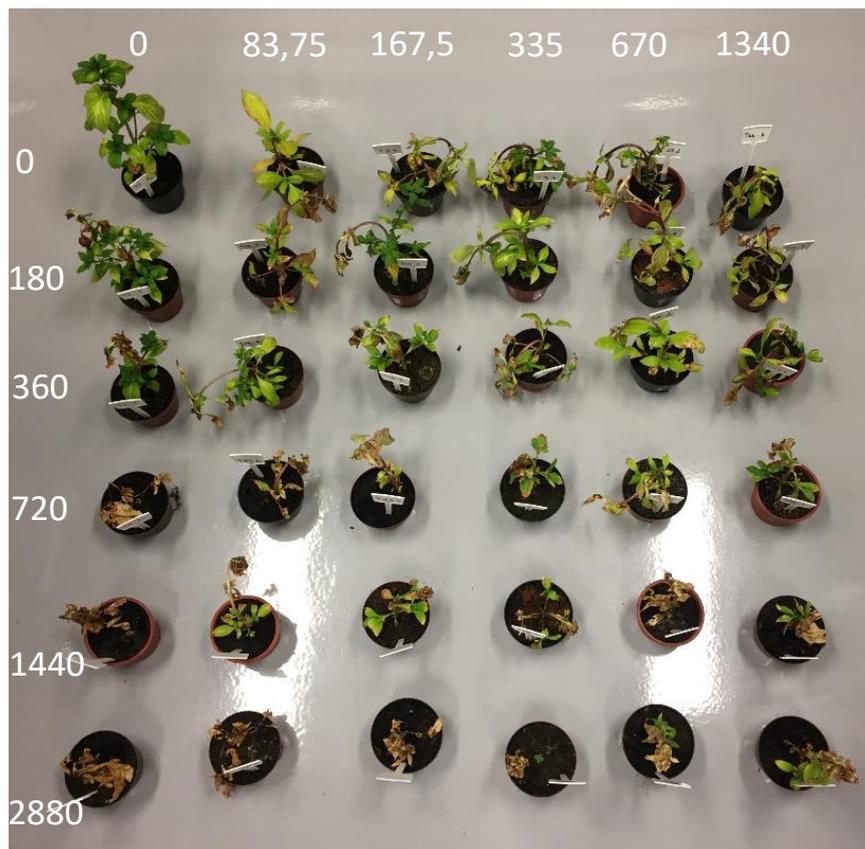


Figura 23. Foto de uma repetição de cada um dos 6 níveis dos fatores glifosato e 2,4-D aos 21 DAA, as linhas representam as doses crescentes de glifosato em g e.a ha⁻¹ (níveis do fator glifosato) e as colunas as doses crescentes de 2,4-D em g e.a ha⁻¹ (níveis do fator 2,4-D) sobre plantas de *Spermacoce verticillata* (vassourinha-de-botão).

Os tratamentos compostos por 2,4-D isolado causaram epinastia e nas maiores doses necrose parcial dos tecidos da parte aérea das plantas, porém não foram capazes de promover controle satisfatório, superior a 80% de *S. verticillata*. As diferenças discutidas entre as doses associadas dos dois herbicidas aos 21 DAA podem ser observadas na Figura 24, com destaque para a redução de controle exercida sobre a dose de 720 g e.a ha⁻¹ de glifosato quando associada ao 2,4-D, onde nota-se que a necrose dos tecidos foi menor do que com a aplicação do glifosato isolado.

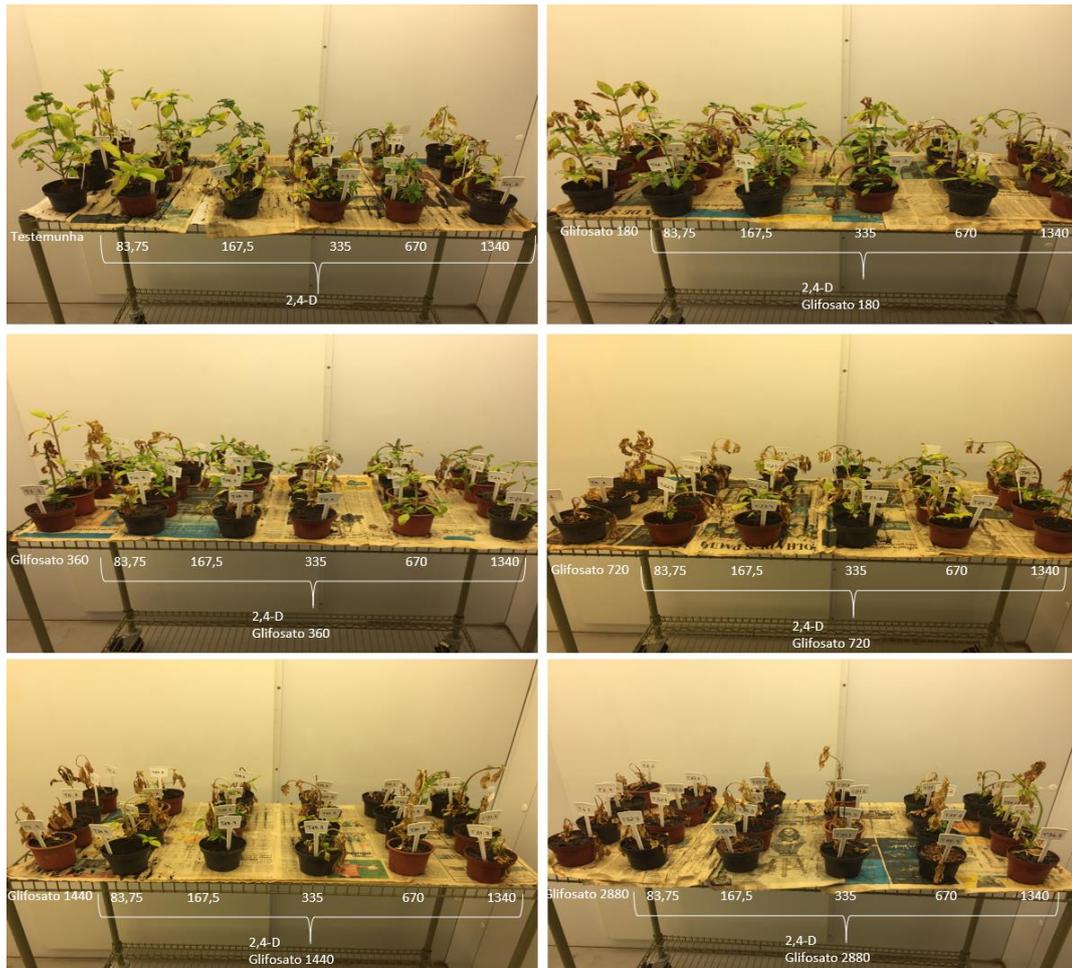


Figura 24. Plantas de *Spermocoe verticillata*, contendo as quatro repetições das 36 interações entre os níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em câmara de crescimento aos 21 DAA, doses de glifosato e 2,4-D expressas em g e.a ha⁻¹.

Os resultados da avaliação de quantificação da matéria seca da parte aérea das plantas aos 21 DAA pode ser observado na tabela 18, onde o glifosato na dose de 180 g e.a ha⁻¹ apresentou resultado igual ao da testemunha, sendo beneficiado pela associação à doses crescentes de 2,4-D, com diferença significativa a partir de 670 g e.a ha⁻¹. Já a dose de 360 g e.a ha⁻¹ de glifosato apresentou redução da matéria seca da parte aérea, diferindo da testemunha, mas não diferindo dos tratamentos com doses superiores. A partir da dose de 360 g e.a ha⁻¹ de glifosato a adição de 2,4-D aos tratamentos com glifosato não promoveram incremento significativo de redução da matéria seca de *S. verticillata*, corroborando a interpretação de que o glifosato é o principal responsável pelo controle dessa planta daninha.

Tabela 18. Desdobramento dos níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em relação a média da matéria seca (g) da parte aérea de *S. verticillata* aos 21 DAA.

Fator A Glifosato (g e.a ha ^{-1a})	Fator B 2,4-D (g e.a ha ⁻¹)											
	0.00		83.75		167.5		335.0		670.0		1340.0	
0.0	2.49	c B	2.18	b B	1.92	b B	1.95	b B	1.67	a B	1.02	a A
180.0	2.04	c B	1.97	b B	1.91	b B	1.76	b B	1.20	a A	0.95	a A
360.0	1.49	b A	1.38	a A	1.50	b A	0.96	a A	1.26	a A	1.18	a A
720.0	0.93	a A	0.71	a A	0.99	a A	0.87	a A	1.14	a A	1.11	a A
1440.0	0.86	a A	0.83	a A	0.91	a A	0.77	a A	0.90	a A	0.96	a A
2880.0	0.74	a A	1.00	a A	0.90	a A	0.82	a A	0.78	a A	0.90	a A

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas são consideradas iguais através do teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

P valor 0.0281

(interação)

CV^b 34

^ag e.a ha⁻¹ = gramas de equivalente ácido por hectare.

^bCV = coeficiente de variação.

As doses de 720, 1440 e 2880 g e.a ha⁻¹ de glifosato resultaram nos maiores níveis de redução da matéria seca da parte aérea das plantas, sendo essas doses isoladas consideradas estatisticamente iguais as suas associações com as diferentes doses de 2,4-D. Os tratamentos de 2,4-D isolados, promoveram pouca redução da matéria seca da parte aérea, sendo os tratamentos testemunha e 2,4-D nas doses até 670 g e.a ha⁻¹ considerados estatisticamente iguais, diferindo apenas do tratamento composto pela maior dose de 1340 g e.a ha⁻¹ de 2,4-D, onde a redução foi maior e significativa (tabela 18).

Na tabela 19 estão presentes os resultados da quantificação da matéria seca das raízes aos 21 DAA, onde o glifosato a partir da menor dose de 180 g e.a ha⁻¹ diferiu estatisticamente da testemunha, sendo beneficiado pela associação à doses crescentes de 2,4-D, com significância a partir de 670 g e.a ha⁻¹ de 2,4-D, enquanto a dose de 360 g e.a ha⁻¹ de glifosato isolado foi considerada estatisticamente igual a dose de 180 g e.a ha⁻¹, porém não houve diferença estatística na redução de matéria seca com a associação ao 2,4-D.

Tabela 19. Desdobramento dos níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em relação a média da matéria seca (g) das raízes de *S. verticillata* aos 21 DAA.

Fator A Glifosato (g e.a ha ^{-1a})	Fator B 2,4-D (g e.a ha ⁻¹)					
	0.00	83.75	167.5	335.0	670.0	1340.0
0.0	1.22 c C	1.55 c D	0.97 b B	0.87 b B	0.76 b B	0.44 a A
180.0	0.78 b B	0.83 b B	0.89 b B	0.76 b B	0.59 b A	0.38 a A
360.0	0.54 b A	0.60 b A	0.36 a A	0.45 a A	0.56 b A	0.42 a A
720.0	0.05 a A	0.28 a A	0.35 a A	0.35 a A	0.59 b B	0.51 a B
1440.0	0.12 a A	0.29 a A	0.32 a A	0.24 a A	0.22 a A	0.37 a A
2880.0	0.05 a A	0.07 a A	0.08 a A	0.19 a A	0.24 a A	0.39 a A

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas são consideradas iguais através do teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

P valor (interação) <0.05

CV^b 39.26

^ag e.a ha⁻¹ = gramas de equivalente ácido por hectare.

^bCV = coeficiente de variação.

As doses de 720, 1440 e 2880 g e.a ha⁻¹ de glifosato resultaram nos maiores níveis de redução da matéria seca das raízes das plantas, sendo essas doses isoladas consideradas estatisticamente iguais. Porém, para a dose de 720 g e.a ha⁻¹ de glifosato quando associado às doses de 670 e 1340 g e.a ha⁻¹ de 2,4-D, houve menor redução da matéria seca das raízes, proporcionando diferença estatística frente ao glifosato isolado e associado com 2,4-D até 335 g e.a ha⁻¹, dado esse que corrobora com aqueles observados anteriormente relativos ao percentual visual de controle, onde essa mesma dose de glifosato resultou em menor eficácia de controle quando associada ao 2,4-D.

As doses de 1440 e 2880 g e.a ha⁻¹ de glifosato resultaram nos maiores níveis de redução da matéria seca das raízes das plantas, sendo consideradas estatisticamente iguais isoladas e quando associadas as diferentes doses de 2,4-D (tabela 19), o que corrobora para a interpretação de que o glifosato é o principal responsável pelo controle dessa planta daninha.

Os tratamentos de 2,4-D isolados apresentaram correlação positiva entre o aumento de dose e a maior redução da matéria seca das raízes, a dose de 83.75 g e.a ha⁻¹ foi considerada igual a testemunha, porém entre 167.5 a 670 g e.a ha⁻¹ há incremento na redução de matéria seca das raízes, sendo os tratamentos considerados iguais e diferindo apenas da maior dose de 1340 g e.a ha⁻¹, que promoveu a maior redução da matéria seca das raízes.

Avaliando as interações entre doses e herbicidas, se nota que o controle de *S. verticillata* através do glifosato na dose de 180 g e.a ha⁻¹ foi beneficiado pela associação à todas as doses de 2,4-D, enquanto na dose de 360 g e.a ha⁻¹ de glifosato a adição do 2,4-D pouco influenciou na redução da matéria seca das raízes e parte aérea, não havendo diferença estatística, mesmo assim as duas doses não foram efetivas para proporcionar controle superior a 80%. A partir da dose de

glifosato de 720 g e.a ha⁻¹ há uma mudança no comportamento do produto isolado e associado, onde a redução da matéria seca da parte aérea não apresentou diferença significativa quando isolado ou associado ao 2,4-D, porém para a matéria seca das raízes, a associação com as duas maiores doses de 2,4-D (670 e 1340 g e.a ha⁻¹) promoveu menor redução da matéria seca das raízes, dado que corrobora para a menor eficácia observada nesse tratamento, frente ao glifosato isolado. Enquanto os tratamentos envolvendo as doses de 1440 e 2880 g e.a ha⁻¹ de glifosato foram considerados estatisticamente iguais na presença ou ausência do 2,4-D, o que sugere que o aumento de dose de glifosato reduz o impacto causado pela associação ao 2,4-D, não havendo redução de eficácia do glifosato.

Uma observação relevante é que aos 7 DAA, nenhum dos tratamentos foram efetivos no controle de *S. verticillata*, tanto os produtos isolados (glifosato e 2,4-D), quanto as suas associações, ou seja, foi necessário um maior período de tempo para o estabelecimento de porcentagens de controle aceitáveis, superiores a 80%, fato que só aconteceu a partir dos 14 DAA. Aos 7 DAA não eram esperados altos níveis de controle, pois os herbicidas glifosato e 2,4-D são herbicidas considerados lentos em sua ação nas plantas, pois o herbicida 2,4-D e outros mimetizadores da auxina, após absorção pela planta ligam-se a receptores químicos presentes na membrana plasmática das células e iniciam uma série de processos complexos, desde o efluxo excessivo de prótons reduzindo o pH do apoplasto, até a liberação de espécies reativas de oxigênio (Martins e Christoffoleti 2015). O hormônio vegetal auxina, para se mover de célula a célula na planta, demanda a ação de proteínas carreadoras de auxina localizadas em diferentes regiões da membrana plasmática e no interior da célula, os carreadores são responsáveis pelo movimento e controle da entrada e saída da forma ânionica, que representa 83% da auxina presente na planta (Mohanta et al. 2018). Estudos reportaram três famílias principais de transportadores auxínicos, sendo os carreadores de influxo de auxina (AUX1/LAX), além dos carreadores de efluxo (PIN) e ABCB (Zazimalova 2015). Carreadores auxínicos também foram identificados nos espaços intracelulares, chamados de PILS (Barbez et al. 2012). Todos esses fatores contribuem para que o período entre a aplicação e a morte da planta seja maior.

O herbicida glifosato apresenta mobilidade pelo floema e transloca até os pontos de crescimento da planta, promovendo a morte dos tecidos meristemáticos, sendo o único herbicida a inibir a EPSPs, sendo considerado um herbicida de ação lenta e com maior potencial para controlar plantas perenizadas, quando comparado aos herbicidas de contato (Duke 2018). A toxicidade promovida pelo glifosato é dependente de um processo de translocação com várias etapas, sendo necessário transpor a cutícula das folhas, parede celular da epiderme, apoplasto,

mesófilo, até atingir o floema e então ser translocado para os pontos de crescimento (Ge et al. 2014).

Por conta dessa ação sistêmica e complexa até a translocação dos herbicidas glifosato e 2,4-D até o sítio da ação, é possível observar uma ação mais lenta desses herbicidas em relação a expressão da sintomatologia, que se observou nesse experimento, onde apenas nas avaliações de 14 DAA, se observou porcentagens de controle superiores a 80%.

A aplicação isolada de glifosato, nas doses de 720, 1440 e 2880 g e.a ha⁻¹ (as maiores doses), foram efetivas no controle de *S. verticillata*, com porcentagens de controle superiores a 95%, indicando que esse herbicida pode ser indicado para o controle dessa planta daninha nessas doses. Em contrapartida, as menores doses de glifosato 180 e 360 g e.a ha⁻¹, não foram efetivas no controle dessa planta daninha no estágio de 2 a 3 pares de ramos laterais.

Resultados semelhantes foram obtidos por (Fadin et al. 2018), objetivando o controle de *Spermacoce verticillata* com 2-4 pares de folhas verdadeiras, os autores aplicaram as doses de 1440 e 2400 g i.a ha⁻¹, e obtiveram um controle de 80 e 89% respectivamente, no entanto os mesmos autores ao aplicarem essas doses em plantas com estágio fenológico mais avançado (4-6 pares de folhas verdadeiras), obtiveram um controle inferior a 55%, dessas forma esses resultados corroboram com os obtidos nesse experimento para plantas em estágio inicial de desenvolvimento, e indicam que para plantas de *S. verticillata*, quanto mais avançado o estágio fenológico, mais complexo se torna a perspectiva do seu manejo, pois mesmo herbicidas que apresentam eficácia de controle uma única aplicação, talvez demandem aplicações sequenciais e/ou misturas com outros ingredientes ativos (Lima et al. 2019).

Em contrapartida o herbicida 2,4-D isolado não foi efetivo no controle de *S. verticillata* em nenhuma dose, a maior porcentagem de controle para esse herbicida foi de 63,75%. Esses resultados corroboram com os obtidos por Jeronimo et al. (2021), os quais aplicando o 2,4-D (1000 g e.a ha⁻¹), em plantas adultas de *Spermacoce verticillata* L., obtiveram aos 21 DAA controle de 46,25 %, enquanto a associação entre glifosato e 2,4-D (1440 + 1000) resultou em controle de 41,25%. Outros autores como (Fadin et al. 2018), testaram 19 tratamentos herbicidas em três estádios de desenvolvimento da planta, onde a aplicação de 2,4-D isolado a 670 e 1000 g e.a ha⁻¹ resultou em controle de 57,5 a 62,5% e 66,3 a 72,5% respectivamente, dados que reforçam a tolerância dessa espécie ao ingrediente ativo 2,4-D. Resultado semelhante foi observado por (Lima et al. 2019) em *Spermacoce densiflora* em quatro estádios de desenvolvimento distintos (4 e 8 pares de folhas oriundos de sementes) e 4 e 8 pares de folhas após rebrota das plantas, onde o 2,4-D isolado apresentou controle aos 21 DAA de 60 e 56% para os dois primeiros estádios e de

apenas 22,5 e 18,75% para os dois estádios após rebrota, indicando o quão significativo é o estágio de desenvolvimento para o controle dessa planta daninha.

Na aplicação de herbicidas para o controle de *S. verticillata* no estágio fenológico de 2 a 3 pares de ramos laterais, a associação do herbicida glifosato com o herbicida 2,4-D resultou em efeitos aditivos, antagônicos ou sinérgicos. Dessa forma podemos constatar que esses efeitos no controle de *S. verticillata*, não ocorrem apenas em função do estágio fenológico da planta daninha, mas em função dos herbicidas aplicados e suas respectivas doses. Trabalhos envolvendo a associação entre glifosato e herbicidas mimetizadores da auxina, como o 2,4-D e outros, foram conduzidos por diversos autores onde é possível encontrar resultados indicando sinergismo ou antagonismo, que variam em função da espécie da planta daninha, estágio de desenvolvimento em que a aplicação é efetuada e a dose dos herbicidas utilizados em associação (Freitas et al. 2018, Joseph et al. 2018, Sanders et al. 2017).

Segundo Koger et al. (2007), a mistura de outros herbicidas com o glifosato tem afetado a sua eficácia, como a associação entre MSMA e glifosato para o controle de plantas daninhas de folha larga e estreita, onde observou redução de controle para *Amaranthus palmeri* e *Echinochloa crus-galli*. Com doses crescentes dos herbicidas para o controle de plantas daninhas de folhas largas em relação a uma taxa fixa de glifosato, houve uma tendência geral de aumento do antagonismo à ação de glifosato, e quando foram aumentadas as doses de glifosato, para acima do nível limite em misturas contendo uma dose fixa de herbicidas para controle de plantas daninhas de folhas largas, foi superado o antagonismo ao glifosato (Soares et al. 2012).

Dessa forma, assim como observado nesse experimento, o aumento da dose do glifosato, pode funcionar como uma ferramenta para mitigar os efeitos antagônicos inerentes a mistura desse herbicida com outros produtos mimetizadores da auxina, principalmente pensando em situações reais e práticas de campo onde infestações de diversas espécies de plantas daninhas ocorrem simultaneamente. Em trabalho conduzido por (Kalsing et al. 2020) em três regiões distintas do cerrado Brasileiro, o tratamento contendo a associação entre glifosato e 2,4-D na dose de 1440 + 780 g e.a ha⁻¹ atingiu controle máximo de *S. verticillata* de 57% aos 21 DAA, enquanto para outras plantas daninhas importantes da família Rubiaceae o controle foi efetivo, sendo de 93% para *Spermacoce latifolia* (Aubl.) e 97% para *Richardia brasiliensis* (Gomes).

Portanto, em relação as interações de glifosato com 2,4-D, observou-se na avaliação de 21 DAA, que para as duas menores doses de glifosato 180 e 360 g e.a ha⁻¹ a associação resultou em aumento geral de controle, enquanto para a dose de 720 g e.a ha⁻¹ houve a maior influência da associação, onde todas as doses de 2,4-D resultaram em redução da eficácia de controle, já as duas maiores doses 1440 e 2880 e.a ha⁻¹ de glifosato não sofreram influência da associação ao 2,4-

D. Dessa forma, uma observação relevante é que o aumento gradativo da dose de glifosato, resultou em mitigação do efeito de antagonismo no controle de *S. verticillata* na associação com 2,4-D.

3.4. Determinação do acúmulo de ácido chiquímico após aplicação de glifosato, 2,4-D e da associação entre os dois herbicidas sobre plantas de *S. verticillata*.

A quantificação do ácido chiquímico após aplicação do glifosato é uma metodologia utilizada para identificação de biótipos resistentes e suscetíveis, por indicar a sensibilidade da enzima EPSPs, mas também contribuir para a análise de quanto produto foi capaz de atingir o sítio de ação (Ndou et al. 2021).

Na figura 25, é possível observar a concentração de ácido chiquímico aos 3 dias após aplicação de diferentes tratamentos contendo doses de glifosato e 2,4-D. Aos 3 dias após a aplicação houve interação significativa entre os fatores glifosato e 2,4-D, sendo possível observar que as parcelas sem glifosato apresentaram concentração inferior de ácido chiquímico, provavelmente o ácido chiquímico endógeno produzido pela planta foi quantificado (0.64 μg).

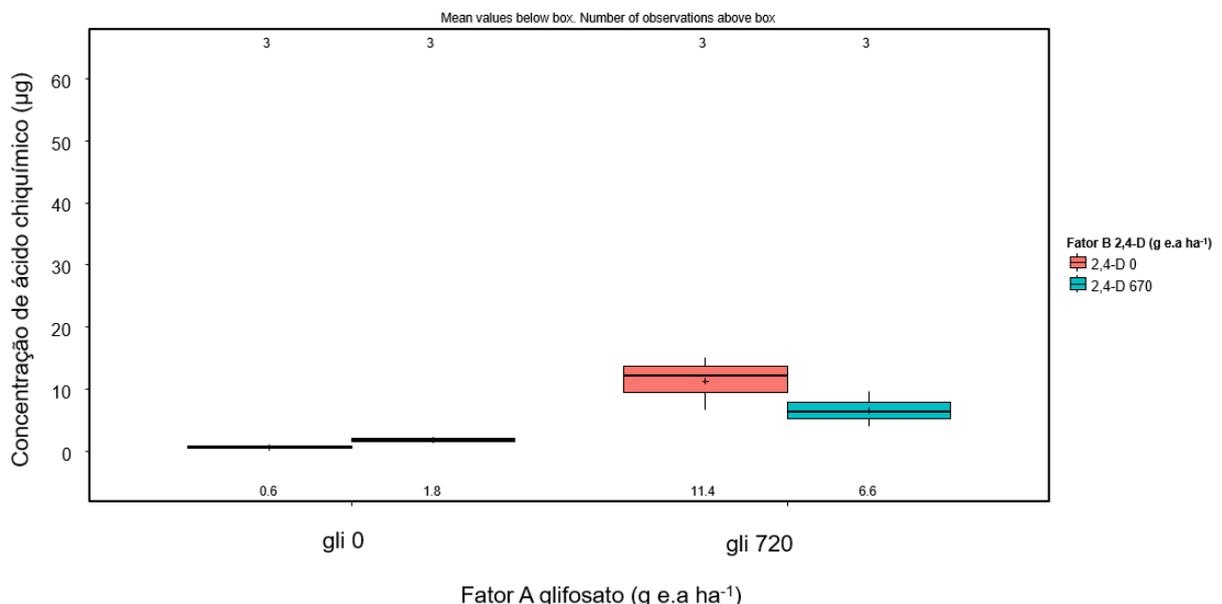


Figura 25. Boxplot da concentração média de ácido chiquímico nos tecidos da parte aérea das plantas de *S. verticillata* aos 3 dias após aplicação de diferentes tratamentos contendo doses de glifosato e 2,4-D. Os números abaixo de cada boxplot indicam a média e o valor acima o número de repetições.

A primeira observação a ser realizada consiste na baixa produção natural de ácido chiquímico, e que o 2,4-D não interferiu nessa produção natural aos 3 DAA, pois não houve

diferença estatística entre o tratamento sem aplicação de herbicidas e apenas com 2,4-D a 670 g e.a ha⁻¹, resultando em concentração de 1,79 µg. Em contrapartida os tratamentos com a presença de glifosato, associados ou não ao 2,4-D, apresentaram um valor superior de concentração de ácido chiquímico, variando de 11,35 a 6,60 µg.

Na tabela 20 é possível observar que o tratamento com glifosato isolado apresentou a maior concentração de ácido chiquímico 11,35 µg, sendo 1,72 vezes superior a concentração encontrada no tratamento onde houve a associação entre glifosato e 2,4-D (720 + 670 g e.a ha⁻¹), mesmo assim, não houve diferença estatística entre ambos tratamentos.

Tabela 20. Desdobramento dos níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em relação a concentração média de ácido chiquímico (µg) na parte aérea das plantas de *S. verticillata* aos 3 DAA.

Fator A Glifosato (g e.a ha ^{-1a})	Fator B 2,4-D (g e.a ha ⁻¹)	
	0	670
0,0	0,64 b A	1,79 a A
720	11,35 a A	6,60 a A

Médias seguidas por mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si através do teste de Tukey ao nível de 0,05% de probabilidade.
DMS^b 5.029
CV^c (%) 49.37

^ag e.a ha⁻¹ = gramas de equivalente ácido por hectare.

^bDMS = diferença mínima significativa; ^cCV = coeficiente de variação.

Aos 7 DAA houve interação significativa entre os fatores glifosato e 2,4-D, o tratamento de glifosato isolado diferiu de todos os demais e apresentou a maior concentração de ácido chiquímico (40,09 µg), enquanto os tratamentos contendo glifosato e 2,4-D associados e 2,4-D isolado foram considerados estatisticamente iguais, sendo apenas o último considerado igual ao tratamento testemunha, que apresentou baixa concentração de ácido chiquímico (Figura 26).

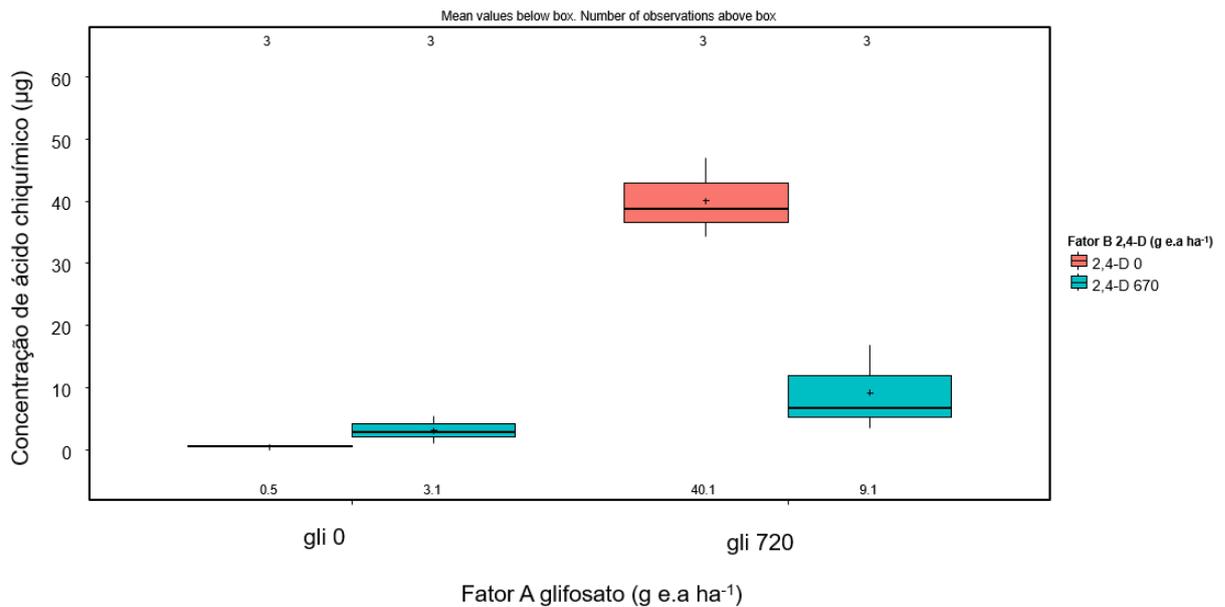


Figura 26. Boxplot da concentração média de ácido chiquímico nos tecidos da parte aérea das plantas de *S. verticillata* aos 7 dias após aplicação de diferentes tratamentos contendo doses de glifosato e 2,4-D. Os números abaixo de cada boxplot indicam a média e o valor acima o número de repetições.

Quando comparamos os dois tratamentos contendo glifosato, isolado e associado ao 2,4-D, é possível observar que a associação entre os dois produtos reduziu o acúmulo de ácido chiquímico significativamente, visto que isolado o acúmulo foi 4,4 vezes superior, o que nos permite inferir que houve menor inibição da enzima EPSPs quando o glifosato foi associado ao 2,4-D (Tabela 21).

Tabela 21. Desdobramento dos níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em relação a concentração média de ácido chiquímico (µg) na parte aérea das plantas de *S. verticillata* aos 7 DAA.

Fator A Glifosato (g e.a ha ^{-1a})	Fator B 2,4-D (g e.a ha ⁻¹)	
	0	670
0,0	0,51 b A	3,08 a A
720	40,09 a A	9,08 a B

Médias seguidas por mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si através do teste de Tukey ao nível de 0,05% de probabilidade.
DMS^b 9.15
CV^c (%) 34.74

^ag e.a ha⁻¹ = gramas de equivalente ácido por hectare.

^bDMS = diferença mínima significativa; ^cCV = coeficiente de variação.

Aos 14 DAA a concentração de ácido chiquímico é menor em todos os tratamentos, essa menor concentração ocorreu visto que os produtos causaram fitotoxicidade nas plantas, necrosaram o tecido e promoveram a inibição do crescimento e desenvolvimento vegetativo (Figura 27). Mesmo assim o tratamento de glifosato isolado continuou apresentando o maior acúmulo de ácido chiquímico, sendo considerado estatisticamente igual ao tratamento de glifosato e 2,4-D associados, que por sua vez diferiram dos tratamentos de 2,4-D isolado e testemunha, ou seja, na presença de glifosato houve maior acúmulo de ácido chiquímico (Tabela 22).

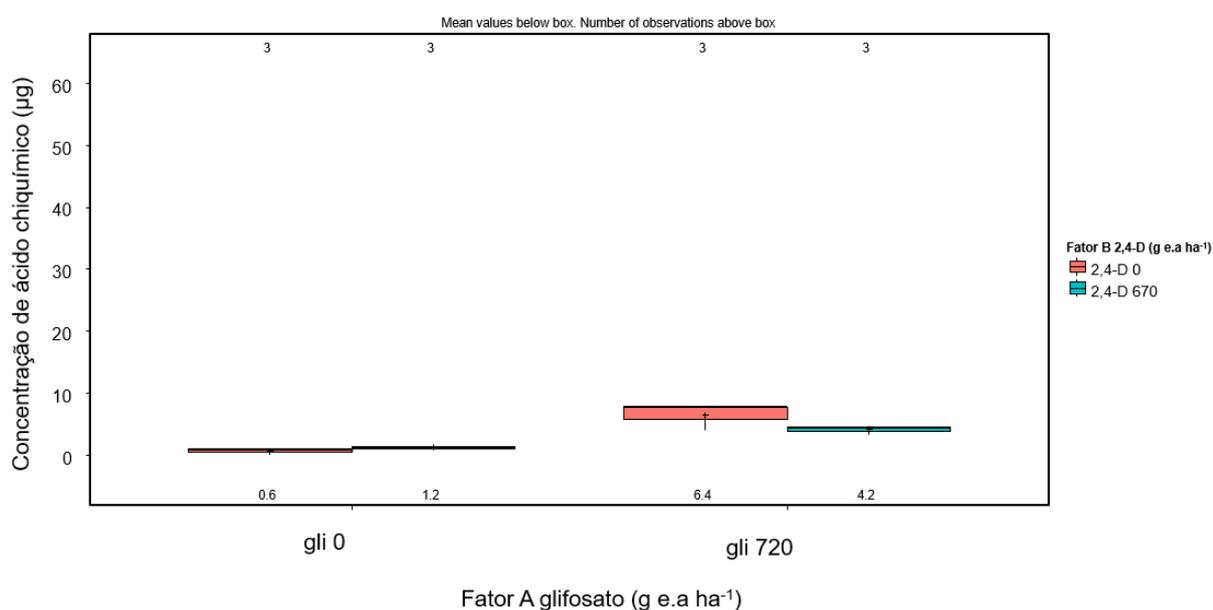


Figura 27. Boxplot da concentração média de ácido chiquímico nos tecidos da parte aérea das plantas de *S. verticillata* aos 14 dias após aplicação de diferentes tratamentos contendo doses de glifosato e 2,4-D. Os números abaixo de cada boxplot indicam a média e o valor acima o número de repetições.

Tabela 22. Desdobramento dos níveis dos fatores glifosato e 2,4-D em relação a concentração média de ácido chiquímico (μg) na parte aérea das plantas de *S. verticillata* aos 14 DAA.

Fator A Glifosato (g e.a ha ^{-1a})	Fator B 2,4-D (g e.a ha ⁻¹)	
	0	670
0,0	0,58 b A	1,22 b A
720	6,44 a A	4,19 a A

Médias seguidas por mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si através do teste de Tukey ao nível de 0,05% de probabilidade.
DMS^b 2.53
CV^c (%) 40.82

^ag e.a ha⁻¹ = gramas de equivalente ácido por hectare.

^bDMS = diferença mínima significativa; ^cCV = coeficiente de variação.

A aplicação de 2,4-D isolado provocou baixo acúmulo de ácido chiquímico, sendo considerado estatisticamente igual ao nível produzido naturalmente pela planta (testemunha), enquanto o glifosato isolado promoveu o maior acúmulo de ácido chiquímico, sendo este parâmetro utilizado como um indicador de alta sensibilidade dos efeitos do glifosato nos tecidos de plantas sensíveis. Dessa forma, o glifosato sobre *S. verticillata*, resultou em acúmulo de ácido chiquímico, demonstrando susceptibilidade dessa planta daninha ao glifosato, o que explica a sua suscetibilidade a esse herbicida, quando aplicado sobre plantas no estágio de 2 a 3 pares de ramos laterais.

(Alcántara-De la Cruz et al. 2020), comprovaram a aplicação de glifosato resultando em acúmulo de ácido chiquímico em *Amaranthus viridis* L., os autores constataram maior acúmulo de ácido chiquímico em um biótipo suscetível dessa planta daninha, que acumulou 240 μg ácido chiquímico a 1000 μM de glifosato, frente a 16, 43 e 33 μg ácido chiquímico em biótipos resistentes.

O maior acúmulo de ácido chiquímico, foi observado na aplicação de glifosato aos 3 e 7 DAA, e aos 14 DAA foi observada uma expressiva redução da concentração de ácido chiquímico, indicando que a maior expressão de sintomatologia, e conseqüentemente maior eficácia do herbicida glifosato ocorrem nos primeiros dias após a aplicação do herbicida, e grandes intervalos de tempo após a aplicação do glifosato, associados aos maiores efeitos deletérios ocasionados pelo glifosato, resultam em redução significativa da concentração de ácido chiquímico aos 14 DAA. Essa informação corrobora com os dados obtidos por (de Almeida et al. 2020), que aplicaram sub doses de glifosato em plantas de *Urochloa plantaginea* (Link.) webster com 3 - 4 perfilhos e 4 a 6 folhas, e aos 0, 3, 6, 9 e 12 dias após sua aplicação (DAT) as plantas foram colhidas e após extração do ácido chiquímico analisadas por HPLC e confirmadas por LC-

MS/MS, onde constatarem concentrações máximas de ácido chiquímico aos seis dias após aplicação do glifosato em plantas de *U. plantaginea* com 4 - 6 folhas.

Os tratamentos com glifosato apresentaram maior concentração e diferiram estatisticamente daqueles sem o herbicida, pois o glifosato mata as plantas por prevenir a biossíntese de aminoácidos aromáticos através da inibição da 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) na rota biossintética do ácido chiquímico (Amrhein et al. 1980b, 1980a). A inibição da EPSPs pelo glifosato resulta em rápido acúmulo de 3PS endógeno, que é armazenado no protoplasto da célula e em seguida desfosforilado a ácido chiquímico (3R,4S,5R-trihydroxy-1-cyclohexene-1-carboxylic acid) pela fosforilase vacuolar. Esse comportamento fisiológico explica o maior acúmulo de ácido chiquímico mediante a aplicação do herbicida glifosato nesse experimento.

A determinação do ácido chiquímico tem sido usada como estimativa indireta do nível de inibição da enzima EPSPs pelo glifosato. Alterações dos níveis de ácido chiquímico nas plantas são resultado da inibição da EPSPs (Amrhein et al. 1980a; Jaworski 1972). Por conseguinte, é possível associar a concentração de ácido chiquímico com a eficácia do glifosato após a sua aplicação em plantas com maior suscetibilidade e/ou comprovar a suscetibilidade de uma determinada espécie ao glifosato.

Dessa forma o acúmulo de ácido chiquímico é um conhecido marcador de inibição de EPSPs em populações com sensibilidade a glifosato (Dillon et al. 2017). Dellaferrera et al. (2018), confirmaram a inibição da via metabólica do ácido chiquímico em todos os biótipos de *A. hybridus* exceto no biótipo SJT1. A ausência de modificação na via do último biótipo confirmou a resistência deste ao glifosato. Após 96 h de aplicação, o acúmulo de ácido chiquímico ao longo das plantas de teste estavam entre 1,92 mg sk g⁻¹ e 2,84 mg sk g⁻¹ de tecido fresco em biótipos sensíveis contra 0,01 mg sk g⁻¹ tecido fresco em biótipo SJT1 resistente. Associando esses resultados, com os obtidos no presente experimento, podemos afirmar que *S. verticillata*, no estágio inicial de desenvolvimento é suscetível ao glifosato, pois quando sua aplicação resultou em acúmulo de ácido chiquímico.

Já na associação entre glifosato e 2,4-D, foi possível observar redução da concentração de ácido chiquímico, quando comparado com a aplicação do glifosato de forma isolada. O menor acúmulo de ácido chiquímico é resultado de menor inibição da enzima EPSPs, dessa forma a planta continua desenvolvendo processos vitais, o que faz com que a resposta da *S. verticillata* à aplicação de glifosato e 2,4-D associados seja antagônica nas doses testadas (Harring et al. 1998). Logo o 2,4-D interfere na produção de ácido chiquímico pelo herbicida glifosato, que em termos

práticos pode reduzir o efeito de controle de glifosato sobre *S. verticillata*, ocasionando antagonismo.

(de Carvalho et al. 2011) estudando o efeito do glifosato sobre três biótipos com suspeita de resistência e um suscetível de *Digitaria insularis*, utilizaram o acúmulo de ácido chiquímico como uma forma de corroborar com os dados de eficácia e observaram maior acúmulo de ácido chiquímico no biótipo suscetível, que foi de 3,3 a 5,7 vezes superior aos 7 DAA frente aos biótipos resistentes, suportando o relato de resistência de populações de *Digitaria insularis* ao glifosato.

4. CONCLUSÕES

A planta daninha *Spermacoce verticillata* apresenta tolerância ao ingrediente ativo 2,4-D e suscetibilidade ao ingrediente ativo glifosato no estágio de desenvolvimento de 2 a 3 pares de ramos laterais. Há interação entre os dois ingredientes ativos herbicidas e o efeito na planta é dependente da dose adotada de cada um, assim, a influência existe e deve ser considerada para uma estratégia de manejo adequada.

O glifosato possui baixa absorção e translocação em *S. verticillata*, parâmetros estes que para a dose de 720 g e.a ha⁻¹ reduzem significativamente na presença de 2,4-D, enquanto para as doses a partir de 1440 g e.a ha⁻¹ não há influência, entretanto o herbicida 2,4-D apresenta absorção e translocação superiores ao glifosato em *S. verticillata* e esses dois parâmetros aumentam na presença do glifosato.

A menor absorção e translocação de glifosato resulta em redução da eficácia de controle, enquanto a maior absorção de 2,4-D não resulta em aumento de eficácia, pois a planta daninha é tolerante a este ingrediente ativo. Porém o incremento de dose do glifosato mostrou ser suficiente para reduzir o impacto promovido pela associação ao 2,4-D.

O elevado impacto na eficácia de controle proporcionado pela associação entre glifosato na dose de 720 g e.a ha⁻¹ e 2,4-D foi confirmado pela redução do acúmulo de ácido chiquímico nas plantas após aplicação dos produtos associados frente ao glifosato isolado, confirmando a hipótese de que a redução na absorção e translocação de glifosato, proporcionou que uma menor quantidade do produto atingisse o sítio de ação e inibisse a enzima EPSPs.

Portanto independente da atividade sistêmica dos herbicidas glifosato e 2,4-D, para o manejo de *S. verticillata* deve-se analisar a dose associada entre ambos para que o controle seja efetivo.

REFERÊNCIAS

- ALAM. Asociacion Latinoamericana de Malezas. Recomendaciones sobre unificación de evaluación en ensayos de control de malezas. ALAM, Bogotá, v.1, n.1, p.35-8, 1974.
- Albrecht, A. J. P. et al. Control of *Conyza* spp. with sequential application of glufosinate in soybean pre-sowing. *Ciência Rural*, 50: 1- 9, 2020.
- Albrecht, A. J. P. et al. Pre-sowing application of combinations of burndown and preemergent herbicides for *Conyza* spp. control in soybean. *Agronomía Colombiana*. 39: 18-25, 2021.
- Alcántara-De la Cruz R, Amaral G da S, de Oliveira GM, Rufino LR, de Azevedo FA, de Carvalho LB, da Silva MFDGF (2020) Glyphosate resistance in *Amaranthus viridis* in Brazilian citrus orchards. *Agric* 10:1–10
- de Almeida SDB, Franco DA de S, Cerdeira AL, de Queiroz SCDN, Matallo MB (2020) Glyphosate on shikimic acid on *Urochloa plantaginea*. *Cienc Rural* 50:1–6
- Amrhein N, Deus B, Gehrke P, Steinrücken HC (1980a) The Site of the Inhibition of the Shikimate Pathway by Glyphosate. *Plant Physiol* 66:830–834
- Amrhein N, Schab J, Steinrücken HC (1980b) The mode of action of the herbicide glyphosate. *Naturwissenschaften* 67:356–357
- Araújo MLS de, Sano EE, Bolfe ÉL, Santos JRN, dos Santos JS, Silva FB (2019) Spatiotemporal dynamics of soybean crop in the Matopiba region, Brazil (1990–2015). *Land use policy* 80:57–67
- Barbez E, Kubeš M, Rolčík J, Béziat C, Pěncík A, Wang B, Rosquete MR, Zhu J, Dobrev PI, Lee Y, Zašimalová E, Petrášek J, Geisler M, Friml J, Kleine-Vehn J (2012) A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature* 485:119–122
- de Carvalho LB, Cruz-Hipólito H, González-Torralva F, da Costa Aguiar Alves PL, Christoffoleti PJ, De Prado R (2011) Detection of Sourgrass (*Digitaria insularis*) Biotypes Resistant to Glyphosate in Brazil. *Weed Sci* 59:171–176
- Castilho J, Forti VA, Monquero PA (2021) Biology and non-chemical management of *Spermacoce verticillata* and *Spermacoce densiflora*. *Renew Agric Food Syst*:2021
- Dellafrera I, Cort E, Panigo E, Prado R De, Id PC, Perreta M (2018) First Report of *Amaranthus hybridus* with Multiple:4–11
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jürgens G, Estelle M (2005) Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell* 9:109–119
- Dillon A, Varanasi VK, Danilova T V., Koo DH, Nakka S, Peterson DE, Tranel PJ, Friebe B, Gill BS, Jugulam M (2017) Physical mapping of amplified copies of the 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate synthase gene in Glyphosate-Resistant *Amaranthus Tuberculatus*. *Plant Physiol* 173:1226–1234
- Duke SO (2018) The history and current status of glyphosate
- Fadin DA, Monquero PA (2019) Leaf characterization of *Spermacoce verticillata* at three stages of development. *Aust J Crop Sci* 13:792–797
- Fadin DA, Tornisielo VL, Barroso AAM, Ramos S, Dos Reis FC, Monquero PA (2018) Absorption and translocation of glyphosate in *Spermacoce verticillata* and alternative herbicide control. *Weed Res* 58:389–396
- Ferreira DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35:1039–1042
- Flint, JL, M Barrett (1989) Antagonism of Glyphosate Toxicity to Johnsongrass (*Sorghum halepense*) by 2,4-D and Dicamba. *Weed Science* 37:700–705

- Fontes, J. R. A.; Tonato, F. Acúmulo de nutrientes por vassourinha-de-botão (*Spermacoce verticillata*), planta daninha de pastagens na Amazônia. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2016. 5 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Circular técnica, 54).
- Freitas NM, Freitas FCL, Furtado IF, Teixeira MFF, Silva VF (2018) Herbicide mixtures to control dayflowers and drift effect on coffee cultures. *Planta Daninha* 36
- Ganie ZA, Jugulam M, Jhala AJ (2017) Temperature influences efficacy, absorption, and translocation of 2,4-d or glyphosate in glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible common ragweed (*ambrosia artemisiifolia*) and giant ragweed (*ambrosia trifida*). *Weed Sci* 65:588–602
- Ge X, D'avignon DA, Ackerman JJH, Sammons RD (2014) In vivo ³¹P-nuclear magnetic resonance studies of glyphosate uptake, vacuolar sequestration, and tonoplast pump activity in glyphosate-resistant horseweed. *Plant Physiol* 166:1255–1268
- Gleason C, Foley RC, Singh KB (2011) Mutant analysis in *Arabidopsis* provides insight into the molecular mode of action of the auxinic herbicide dicamba. *PLoS One* 6
- González-Torralva F, Rojano-Delgado AM, Luque de Castro MD, Müllerder N, De Prado R (2012) Two non-target mechanisms are involved in glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.) biotypes. *J Plant Physiol* 169:1673–1679
- Groeninckx I, Dessein S, Ochoterena H, Persson C, Motley TJ, Kårehed J, Bremer B, Huysmans S, Smets E (2009) Phylogeny of the herbaceous tribe spermacoceae (Rubiaceae) based on plastid dna data. *Ann Missouri Bot Gard* 96:109–132
- Grossmann K (2010) Auxin herbicides: Current status of mechanism and mode of action. *Pest Manag Sci* 66:113–120
- Harring T, Streibig JC, Husted S (1998) Accumulation of Shikimic Acid: A Technique for Screening Glyphosate Efficacy. *J Agric Food Chem* 46:4406–4412
- Heap, I. The International Herbicide-Resistant Weed Database. Online. Sunday, December 12, 2021. Available www.weedscience.org
- Ivanova-Petropulos V, Petruševa D, Mitrev S (2020) Rapid and Simple Method for Determination of Target Organic Acids in Wine Using HPLC-DAD Analysis. *Food Anal Methods* 13:1078–1087
- Izuogu NB, Bello OE, Bello OM (2020) A review on *Borreria verticillata*: A potential bionematicide, channeling its significant antimicrobial activity against root-knot nematodes. *Heliyon* 6:e05322
- Jaworski, E. G. 1972. Mode of action of N-phosphonomethyl-glycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.* 20:1195–1198.
- Jelihovschi E, Faria JC, Allaman IB (2014) ScottKnott: A Package for Performing the Scott-Knott Clustering Algorithm in R. *TEMA (São Carlos)* 15:003
- Jeronimo, A. V. ; Pires, R. S. ; Santos, P. H. V. ; Hirata, ACS ; Monquero, Patricia Andrea. Sequential applications of herbicides in the management of weeds at an advanced stage of development. *Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences / Revista De Ciências Agrárias*, v. 64, p. 1-8, 2021.
- Joseph DD, Marshall MW, Sanders CH (2018) Efficacy of 2,4-D, Dicamba, Glufosinate and Glyphosate Combinations on Selected Broadleaf Weed Heights. *Am J Plant Sci* 09:1321–1333
- Kalsing A, Rossi CVS, Lucio FR, Minozzi GB, Gonçalves FP, Valeriano R (2020) Efficacy of control of glyphosate-tolerant species of the rubiaceae family through double-knockdown applications. *Planta Daninha* 38

- Kelley KB, Riechers DE (2007) Recent developments in auxin biology and new opportunities for auxinic herbicide research. *Pestic Biochem Physiol* 89:1–11
- Koger, C.H.; Burke, I.C.; Miller, D.K.; Kendig, J.A.; Reddy, K.N.; Wilcut, J.W. MSMA antagonizes glyphosate and glufosinate efficacy on broadleaf and grass weeds. *Weed Technol.* 2007, 21, 159–165.
- Li J, Han H, Bai L, Yu Q (2020) 2,4-D antagonizes glyphosate in glyphosate-resistant barnyard grass *Echinochloa colona*. *J Pestic Sci* 45:109–113
- Lima CC, Silva RP da, Jeronimo AV, Hirata ACS, Monquero PA (2019) Estágios fenológicos associados ao controle químico no manejo de *Spermacocea densiflora* originada de sementes e rebrota. *Rev Bras Herbic* 18
- Lym RG (2000) Leafy spurge (*Euphorbia esula*) control with glyphosate plus 2,4-D. *J Range Manag* 53:68–72
- Macedo, J. F., Brandão, M., Lara, J. F. R. Plantas daninhas na pós-colheita de milho nas várzeas do rio São Francisco, em Minas Gerais. *Planta Daninha*, v. 21, n. 2, p. 239-248, 2003
- Martins BAB, Cabral EL, Souza VC, Christoffoleti PJ (2009) A new variety of the weed *Borreria densiflora* DC. (Rubiaceae). *Weed Biol Manag* 9:286–291
- Martins, B.A.B.; Chamma, H.M.C.P.; Dias, C.T.S.; Christoffoleti, P.J. 2010. Germination of *Borreria densiflora* var. *latifolia* under controlled conditions of light and temperature. *Planta Daninha* 28: 301-307 (in Portuguese, with abstract in English). [Links]
- Martins BAB, Christoffoleti PJ (2014) Herbicide efficacy on *Borreria densiflora* control in pre- and post-emergence conditions. *Planta Daninha* 32:817–825
- Martins BAB, Christoffoleti PJ (2015) Buttonweed emergence as affected by seed burial depth and straw on the soil surface. *Sci Agric* 72:489–494
- Marques, L. J. P., Silva, M. R. M., Araújo, M. S., Lopes, G. S., Corrêa, M. J. P., Freitas, A. C. R., Muniz, F. H. Floristic composition of weeds in the cowpea (*Vigna unguiculata*) culture under the chopped secondary forest system. *Planta Daninha*, v. 28, n. SPE, p. 939-951, 2010.
- Mascarenhas, R. E., Junior, M., Dutra, S., Souza Filho, A. D. S., Teixeira Neto, J. F. Plantas daninhas de uma pastagem cultivada de baixa produtividade no nordeste paraense. *Embrapa Amazônia Oriental- Artigo em periódico indexado (ALICE)*, 2000.
- Mohanta TK, Bashir T, Hashem A, Abd_allah EF, Khan AL, Al-Harrasi AS (2018) Molecular players of auxin transport systems: Advances in genomic and molecular events*. *J Plant Interact* 13:483–495
- Monquero PA, Christoffoleti PJ, Osuna MD, De Prado RA (2004) Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. *Planta Daninha* 22:445–451
- M. Li, H. Tank, A. Kennedy, H. Zhang, B. Downer, D. Ouse, and L. Liu, "Enlist Duo Herbicide: A Novel 2,4-D Plus Glifosato/Glifosato Premix Formulation with Low Potential for Off-target Movement." eds. M. Bernards and B. Devisetty *STP1558-EB Pesticide Formulation and Delivery Systems: 32nd Volume, Innovating Legacy Products for New Uses*. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2013. 3-14. Web. 13 Feb 2020.
- Ndou V, Pieterse PJ, Brand DJ, Vorster A, Louw A, Phiri E (2021) Mechanism(S) of glyphosate resistance in a selected plantago lanceolata (l.) r biotype. *Agronomy* 11
- Nepomuceno FAA, De Souza EB, Nepomuceno IV, Miguel LM, Cabral EL, Loiola MIB (2018) The genus *Borreria* (Spermacocea, Rubiaceae) in the state of Ceará, Brazil. *Rodriguesia* 69:715–731
- Ou J, Thompson CR, Stahlman PW, Bloedow N, Jugulam M (2018) Reduced Translocation of Glyphosate and Dicamba in Combination Contributes to Poor Control of *Kochia scoparia*: Evidence of Herbicide Antagonism. *Sci Rep* 8:1–11

- Palma-Bautista C, Cruz-Hipólito HE, Alcántara-de la Cruz R, Vázquez-García JG, Yannicari M, De Prado R (2021) Comparison of premix glyphosate and 2,4-D formulation and direct tank mixture for control of *Conyza canadensis* and *Epilobium ciliatum*. *Environ Pollut* 281
- De Queiroz ARS, Delatorre CA, Lucio FR, Rossi CVS, Zobiole LHS, Merotto A (2019) Rapid necrosis: A novel plant resistance mechanism to 2,4-D. *Weed Sci* 68:6–18
- dos Reis LC, Silva CMS e., Bezerra BG, Mutti PR, Spyrides MHC, da Silva PE (2020) Analysis of Climate Extreme Indices in the MATOPIBA Region, Brazil. *Pure Appl Geophys* 177:4457–4478
- Sanders CH, Joseph DD, Marshall MW (2017) Efficacy of Selected Herbicide Programs in 2,4-D Tolerant Cotton (&i>Gossypium hirsutum&/i> L.). *Agric Sci* 08:1157–1167
- Santos WF, Procópio S de O, da Silva AG, Fernandes MF, dos Santos ER (2018) Fitossociologia de plantas daninhas na região sudoeste de Goiás. *Acta Sci - Agron* 40:1–11
- Scheffe, Henry. *The analysis of variance*. Vol. 72. John Wiley & Sons, 1999.
- Schumann, K. M. Rubiaceae, Spermaceae. In: C. P. F. Martius (Ed.), *Flora Brasiliensis*, v.6, n.6, p.62-71, 1888.
- Scott, A.J.; Knott, M.A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, Raleigh, v.30, n.3, p.507-512, Sept. 1974.
- da Silva, Paulo Vinicius; Costa, P. H. S. M. ; Oliveira, M. V. B. ; Barros, D. M. ; Molina, D. Z. ; Dias, R. C. ; Monquero, P. A. ; Inacio, E. M. . Estratégias de controle de *Conyza* spp. em pré-plantio da soja: aplicações únicas ou sequenciais?. *Research, Society and Development*, v. 10, p. 1-9, 2021.
- Skelton JJ, Simpson DM, Peterson MA, Riechers DE (2017) Biokinetic Analysis and Metabolic Fate of 2,4-D in 2,4-D-Resistant Soybean (*Glycine max*). *J Agric Food Chem* 65:5847–5859
- Soares DJ, Oliveira WS, López-Ovejero RF, Christoffoleti P. (2012) Control of glyphosate resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) with dicamba and 2,4-D. *Planta Daninha* 30:401–406
- Taiz, L.; Zeiger, E.; Møller, I.M.; Murphy, A. *Plant Physiology and Development*, 6th ed.; Sinauer Associates Incorporated: Sunderland, MA, USA, 2015; p. 761.
- The Plant List, 2021. Version 1. Published on the Internet. Retrieved on 12 December 2021 from <http://www.theplantlist.org/>.
- Vargas LA, Passos AMA, Karam D (2018) Allelopathic potential of cover crops in control of shrubby false buttonweed (*Spermaceae verticillata*). *Planta Daninha* 36
- Zazimalova E (2015) Why So Many? -- Auxin Transporters .pdf:1–15
- Zelaya IA, Anderson JAH, Owen MDK, Landes RD (2011) Evaluation of spectrophotometric and HPLC methods for shikimic acid determination in plants: Models in glyphosate-resistant and -susceptible crops. *J Agric Food Chem* 59:2202–2212
- Zhang M, Abrahao G, Thompson S (2021) Sensitivity of soybean planting date to wet season onset in Mato Grosso, Brazil, and implications under climate change. *Clim Change* 168