

**VINICIUS GABRIEL CANEPPELE PEREIRA**

**EFEITO DO DICAMBA, ÁCIDO SALICÍLICO E 3,6-DICLOROSALICÍLICO NA  
FISIOLOGIA E METABOLISMO DA SOJA COM O GENE DMO**

**Botucatu**

**2023**



**VINICIUS GABRIEL CANEPPELE PEREIRA**

**EFEITO DO DICAMBA, ÁCIDO SALICÍLICO E 3,6-DICLOROSALICÍLICO NA  
FISIOLOGIA E METABOLISMO DA SOJA COM O GENE DMO**

Tese apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus  
de Botucatu, para obtenção do título de  
Doutor em Agronomia (Agricultura).

Orientador: Prof. Dr. Caio Antonio  
Carbonari

**Botucatu**

**2023**

P436e      Pereira, Vinicius Gabriel Caneppele  
Efeito do dicamba, ácido salicílico e 3,6-diclorosalicílico na fisiologia e metabolismo da soja com o gene dmo / Vinicius Gabriel Caneppele Pereira. -- , 2023  
67 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu,  
Orientador: Caio Antonio Carbonari

1. Herbicidas. 2. Metabólito. 3. Degradação. 4. Biotecnologia.  
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

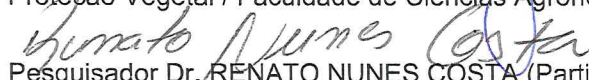
Título:

EFEITO DO DICAMBA, ÁCIDO SALICÍLICO E 3,6-DICLOROSALICÍLICO NA FISIOLOGIA E  
METABOLISMO DA SOJA COM O GENE DMO

AUTOR: VINICIUS GABRIEL CANEPPELE PEREIRA

ORIENTADOR: CAIO ANTONIO CARBONARI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Agronomia  
(Agricultura), pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. CAIO ANTONIO CARBONARI (Participação Presencial)  
Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu  
Pesquisador Dr. TIAGO GAZOLA (Participação Virtual)  
./ CTC Tecnologia Canavieira  
Prof. Dr. EDIVALDO DOMINGUES VELINI (Participação Presencial)  
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu  
Pesquisador Dr. RENATO NUNES COSTA (Participação Presencial)  
./ BioAtiva  
Prof. Dr. CARLOS GILBERTO RAETANO (Participação Presencial)  
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu UNESP

Botucatu, 30 de novembro de 2023.



*A minha esposa Tainara*

*Aos meus pais Marcio e Sonara*

*Aos meus irmãos Gabriella e Bruno*

*dedico*



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por me proporcionar paciência e sabedoria para vencer os obstáculos e por me agraciar com pessoas especiais nesta jornada.

Aos meus pais Marcio e Ionara e aos meus irmãos Gabriella e Bruno, pela base familiar e por todos os ensinamentos, momentos compartilhados e apoio incondicional. A família é o principal alicerce em nossas vidas.

À minha esposa Tainara, por todo amor, carinho, atenção, paciência e motivação durante esta jornada e a sua família pela receptividade, amizade e confiança.

Aos professores Caio Antonio Carbonari e Edivaldo Domingues Velini, pela orientação durante a condução destes estudos, pelas oportunidades proporcionadas, pela confiança depositada e por compartilharem seus conhecimentos.

Aos amigos e professores Alfredo Junior Paiola Albrecht e Leandro Paiola Albrecht, pelo incentivo a pesquisa e a pós-graduação.

Ao Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM) por toda estrutura e condições de trabalho proporcionadas durante estes anos de estudo.

À Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA – Unesp Botucatu), ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Agricultura e a todos os docentes que fizeram parte desta formação.

Aos amigos Bruno, Danilo, Fabio, Natalia, Renato e Victor pelo apoio e amizade durante estes anos e pelos momentos de descontração proporcionados. Aos técnicos e amigos do NUPAM José Guilherme, Marcelo Siono e José Roberto por toda ajuda proporcionada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – CAPES, pela concessão da bolsa neste período – Código de financiamento 001.

À Bayer CropScience pelo suporte com os materiais de estudo e seus pesquisadores Ramiro Ovejero e Matheus Palhano pelo suporte técnico. Aos colegas Ricardo Alcântara e Elerson Rocha pelo apoio nas pesquisas.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma estiveram presentes e fizeram parte desta fase.

Muito Obrigado!



## RESUMO

Um dos grandes desafios da cadeia produtora de soja é o aumento da produtividade de grãos sem a necessidade de abertura de novas áreas de produção, buscando a manutenção dos custos através do aprimoramento de técnicas e práticas que visem incrementar a produtividade. O advento de novas biotecnologias proporciona maiores flexibilidades e uso de ferramentas para o manejo integrado de plantas daninhas, como o uso do herbicida dicamba. Porém, o comportamento deste herbicida em plantas geneticamente modificadas, bem como os efeitos do metabólito oriundo da degradação do dicamba, precisam ser compreendidos. Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar a dinâmica do herbicida dicamba e do metabólito 3,6-DCSA em plantas de soja, bem como os efeitos desencadeados após a aplicação destes compostos no metabolismo. Para tanto, experimentos foram conduzidos em casa de vegetação utilizando plantas de soja geneticamente modificadas com a inserção do gene *dmo*, as quais foram submetidas a aplicação de três tratamentos em pós-emergência no estádio V3, sendo dicamba, 3,6-diclorosalicílico, ácido salicílico e uma testemunha, onde todos os tratamentos foram aplicados na dose de 720 g.e.a ha<sup>-1</sup>. Avaliou-se as trocas gasosas das plantas aos 4, 72, 168 e 336 HAA, e nos mesmos períodos, amostras destas plantas foram coletadas para avaliação dos teores internos de dicamba e 3,6-DCSA, além dos compostos da rota do ácido chiquímico. As plantas de soja com o gene *dmo* apresentaram pequenas reduções na assimilação líquida de CO<sub>2</sub> em condições de aplicação do herbicida dicamba em pós emergência na dose de 720 g.e.a ha<sup>-1</sup>. No entanto, estas reduções não comprometem o desempenho de outras variáveis, como a eficiência de carboxilação. A biotecnologia de soja com o gene *dmo* mostra-se eficiente na degradação do dicamba a partir da conversão do herbicida em 3,6-diclorosalicílico, sendo encontrado grandes concentrações do metabólito após 7 dias da aplicação do herbicida. Faz-se necessário maiores estudos para o aprimoramento do entendimento sobre possíveis efeitos de herbicidas auxínicos sobre compostos produzidos via rota do ácido chiquímico. Compostos salicilatos como o produto da degradação do dicamba pela biotecnologia, pode apresentar influência na produção de alguns compostos da rota do ácido chiquímico, tais como ácido salicílico e ácido quínico.

**Palavras-chave:** herbicidas; metabólito; degradação; biotecnologia.



## ABSTRACT

One of the great challenges of the soybean production chain is increasing grain productivity without the need to open new production areas, seeking to maintain costs through the improvement of techniques and practices aimed at increasing productivity. The advent of new biotechnologies provides greater flexibility and the use of tools for the integrated management of weeds, such as the use of the herbicide dicamba. However, the dynamic of this herbicide in genetically modified plants, as well as the effects of the metabolite resulting from dicamba degradation, need to be understood. Therefore, the aim of this work is to evaluate the dynamic of the herbicide dicamba and the 3,6-DCSA metabolite in soybean plants, as well as the effects triggered after the application of these compounds. To this end, experiments were conducted in a greenhouse using genetically modified soybean plants with the insertion of the dmo gene, which were subjected to the application of three post-emergence treatments at the V3 stage, including dicamba, 3,6-dichlorosalicylic acid, salicylic acid, and a control, where all treatments were applied at a dose of 720 g.e.a. ha<sup>-1</sup>. The gas exchange of the plants was evaluated at 4, 72, 168 and 336 HAA, and in the same periods, samples of these plants were collected to evaluate the internal levels of dicamba and 3,6-DCSA, in addition to the compounds of shikimic acid. Soybean plants with the dmo gene showed small reductions in net CO<sub>2</sub> assimilation under conditions of post-emergence application of the herbicide dicamba at a dose of 720 g.e.a ha<sup>-1</sup>. However, these reductions do not compromise the performance of other variables, such as carboxylation efficiency. Soybean biotechnology with the dmo gene is efficient in degrading dicamba by converting the herbicide into 3,6-dichlorosalicylic acid, with high concentrations of the metabolite being found 7 days after applying the herbicide. Further studies are needed to improve our understanding of the possible effects of auxin herbicides on compounds produced via the shikimic acid route. Salicylate compounds, such as the degradation product of dicamba by biotechnology, may influence the production of some compounds from the shikimic acid pathway, such as salicylic acid and quinic acid.

**Keywords:** herbicides; metabolite; degradation; biotechnology.



## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Rota do ácido chiquímico e síntese de aminoácidos aromáticos .....                                                                                                                                     | 31 |
| Figura 2 - Temperatura mínima, máxima e média durante o período de condução dos ensaios em casa de vegetação em Botucatu, SP .....                                                                                | 34 |
| Figura 3 - Sequência esquemática do processo de coleta e extração das amostras para análise dos compostos em cromatografia .....                                                                                  | 36 |
| Figura 6 - Assimilação líquida de CO <sub>2</sub> (A) (A) e eficiência de carboxilação (EC) (B) de plantas de soja com o gene <i>dmo</i> submetidas a aplicação de diferentes tratamentos em pós-emergência ..... | 39 |
| Figura 7 - Condutância estomática (gs) (A) e concentração interna de CO <sub>2</sub> (Ci) (B) de plantas de soja com o gene <i>dmo</i> submetidas a aplicação de diferentes tratamentos em pós-emergência .....   | 41 |
| Figura 8 – Taxa de transpiração (E) (A) e eficiência no uso da água (EUA) (B) de plantas de soja com o gene <i>dmo</i> submetidas a aplicação de diferentes tratamentos em pós-emergência .....                   | 42 |
| Figura 9 – Teores de dicamba e 3,6-DCSA em plantas de soja (DMO-1) com o gene <i>dmo</i> submetidas a aplicação de dicamba em pós-emergência .....                                                                | 44 |
| Figura 10 – Teores de fenilalanina (A), tirosina (B) e triptofano (C) em plantas de soja com o gene <i>dmo</i> submetidas a aplicação de diferentes tratamentos em pós-emergência .....                           | 47 |
| Figura 11 – Teores de ácido chiquímico (A) e ácido salicílico (B) em plantas de soja com o gene <i>dmo</i> submetidas a aplicação de diferentes tratamentos em pós-emergência .....                               | 49 |
| Figura 12 – Teores de ácido cumárico (A) e ácido quínico (B) em plantas de soja com o gene <i>dmo</i> submetidas a aplicação de diferentes tratamentos em pós-emergência .....                                    | 50 |
| Figura 13 – Teores de ácido clorogênico (A) e ácido ferúlico (B) em plantas de soja com o gene <i>dmo</i> submetidas a aplicação de diferentes tratamentos em pós-emergência .....                                | 51 |



## **LISTA DE TABELAS**

|                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabela 1 - Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação dos compostos analisados.....</b> | <b>37</b> |
| <b>Tabela 2 - Massa molecular e íons secundários dos compostos analisados....</b>                         | <b>37</b> |



## SUMÁRIO

|            |                                                                             |           |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                      | <b>19</b> |
| <b>2</b>   | <b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                           | <b>22</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Cultura da Soja.....</b>                                                 | <b>22</b> |
| <b>2.2</b> | <b>Interferência e controle de plantas daninhas na cultura da soja.....</b> | <b>23</b> |
| <b>2.3</b> | <b>Bioteχνologias na cultura da soja.....</b>                               | <b>26</b> |
| <b>2.4</b> | <b>O herbicida dicamba.....</b>                                             | <b>27</b> |
| <b>2.5</b> | <b>Resistência Sistêmica Adquirida (SAR).....</b>                           | <b>30</b> |
| <b>3</b>   | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                              | <b>34</b> |
| <b>4</b>   | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                          | <b>39</b> |
| <b>5</b>   | <b>CONCLUSÕES.....</b>                                                      | <b>55</b> |
|            | <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                    | <b>57</b> |
|            | <b>APÊNDICE A .....</b>                                                     | <b>67</b> |
|            | <b>APÊNDICE B .....</b>                                                     | <b>67</b> |



## 1 INTRODUÇÃO

A soja é uma das principais commodities produzidas e negociadas no mundo, destacando-se o Brasil como o maior produtor mundial na safra 2022/2023, com uma produção de 156 milhões de toneladas de soja, representando aproximadamente 42% de toda a produção mundial deste grão. A produção brasileira de soja está distribuída em aproximadamente 44 milhões de hectares na atual safra, área cerca de 6,1% maior com relação à safra 2021/2022 com produtividade média de 3.507 kg ha<sup>-1</sup>.

Um dos grandes desafios da cadeia produtora de soja é o aumento da produtividade de grãos sem a necessidade de abertura de novas áreas de produção, buscando a manutenção dos custos através do aprimoramento de técnicas e práticas que visem incrementar a produtividade. Desta maneira, o estudo de técnicas e manejos que se adequem a este objetivo são de extrema importância para a expressão do potencial máximo de produção da cultura.

Uma das alternativas neste contexto de produção é a adoção de culturas modificadas geneticamente, as quais visam entre outras características, a resistência ao ataque de insetos e a aplicação em pós-emergência de herbicidas inicialmente não seletivos. De acordo com o conselho de informações sobre biotecnologia – CIB, aproximadamente 92,3% da soja produzida no Brasil é oriunda de plantas transgênicas, demonstrando a aceitação por parte do produtor rural na adoção destas tecnologias no campo, principalmente no que diz respeito a segurança na produção, reduzindo riscos de perdas pelo ataque de insetos, competição com plantas daninhas ou doenças (CIB, 2018). Alguns eventos transgênicos aprovados no Brasil estão relacionados principalmente com a resistência ao ataque de pragas, como o complexo de lagartas e a resistência a aplicação de herbicidas como por exemplo o glyphosate, 2,4-D, amônio glufosinato e mais recentemente com aprovação no Brasil a resistência ao herbicida dicamba (CTNBIO, 2023).

O evento conhecido como Roundup Ready™ 2 Xtend™ foi obtido através de melhoramento genético convencional a partir do cruzamento entre cultivares de soja transgênica que possuem resistência a insetos e ao glyphosate com a soja tolerante ao dicamba e resistente a insetos. O evento obtido produz as proteínas Cry1Ac, Cry1A.105 e Cry2Ab2, as quais proporcionam a resistência ao ataque de lagartas e as proteínas CP4 EPSPS e DMO conferindo tolerância aos herbicidas glyphosate e dicamba, respectivamente (CTNBIO, 2023). O gene *dmo* foi obtido a partir de uma

bactéria de solo, *Stenotrophomonas maltophilia*, a qual produz nas plantas transgênicas a enzima dicamba mono-oxigenase (DMO), responsável por conferir tolerância ao herbicida dicamba. A enzima DMO é capaz de inativar a molécula herbicida antes de alcançar níveis tóxicos à planta, convertendo-a em ácido 3,6-diclorosalicílico (3,6-DCSA), um composto que não apresenta atividade herbicida (BEHRENS et al., 2007).

Bhatti; Feng; Pitkin, (2014) observaram que plantas que possuem o gene *dmo*, apresentaram melhorias em sua sanidade após a aplicação de dicamba, verificando que o metabólito 3,6-DCSA pode possuir efeitos benéficos a planta. Entre estes benefícios verificados, destaca-se o aumento na resistência contra estresse oxidativo e maior resistência a doenças. De maneira geral, observa-se que o metabólito proveniente da degradação do dicamba é capaz de induzir uma resposta imediata através da resistência sistêmica adquirida (SAR). O metabólito 3,6-DCSA apresenta comportamento análogo ao ácido salicílico, uma vez que outros compostos derivados de salicilatos também estão relacionados ao efeito de indução da resistência sistêmica adquirida (FAIZE; FAIZE, 2018). Plantas com o gene *dmo* ao receberem aplicação de dicamba e posteriormente induzidas ao estresse oxidativo com a aplicação de sub-doses de paraquat (30 g i.a ha<sup>-1</sup>), apresentaram redução de 50% de injúria visual quando comparado com plantas sem aplicação prévia de dicamba, sendo o mesmo observado para plantas sem o gene *dmo* e tratadas previamente com 3,6 – DCSA (BHATTI; FENG; PITKIN, 2014).

A compreensão do efeito deste metabólito em plantas de soja com e sem o gene de resistência ao dicamba, pode proporcionar ganhos no desempenho produtivo, aumento da resistência destas plantas a estresse abióticos e na indução da resistência sistêmica adquirida, podendo reduzir danos causados pela infecção por patógenos, por exemplo. Estes possíveis efeitos tendem a favorecer a produção de soja, otimizando o uso de produtos fitossanitários e condicionando o melhor desempenho das plantas em condições de adversidades como situações de estresse hídrico. Os efeitos na redução de injúrias visuais oriundos de estresses oxidativos e na redução ao ataque de patógenos são encontrados na literatura, no entanto estudos mais detalhados com relação aos efeitos de 3,6-DCSA no metabolismo e fisiologia das plantas de soja são necessários para compreender o potencial de uso deste metabólito diante da crescente utilização do herbicida dicamba em eventos geneticamente modificados, bem como faz-se necessário compreender se há algum

efeito deste metabólito em importantes rotas de síntese de aminoácidos, com a rota do ácido chiquímico.

Diante do exposto, levanta-se a hipótese de que a aplicação de 3,6-DCSA em plantas de soja com o gene *dmo*, deve desencadear estímulos em rotas de síntese de compostos específicos, como a rota do ácido chiquímico. Assim, justifica-se o estudo dos efeitos deste metabólito em soja, visando compreender e explorar os eventos desencadeados após sua aplicação.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Cultura da Soja

A soja cultivada [*Glycine max* (L.) Merrill] é nativa do leste da Ásia, especificamente do nordeste da China, uma área também conhecida como Manchúria (HYMOWITZ, 1970). Considerada uma das culturas mais antigas, a soja foi relatada no ocidente no final do século XV e início do século XVI (BORÉM et al., 2022). Dentre as culturas oleaginosas, a soja é considerada a de maior destaque a nível nacional e mundial, sendo responsável por 97% da produção brasileira e 61% da produção mundial de culturas oleaginosas, incluindo óleo de coco, caroço de algodão, palma, amendoim, canola e girassol (USDA, 2023).

O cultivo de soja no Brasil iniciou-se no Rio Grande do Sul em 1935, sendo a Alemanha o primeiro país a importar a soja brasileira por volta de 1938. Em 1941, o Rio Grande do Sul cultivava aproximadamente 702 ha desta oleaginosa, tendo seu cultivo se expandido para as regiões Sudeste, Norte e Nordeste por volta de 1950 (SEDIYAMA; TEIXEIRA; BARROS, 2009).

A soja é uma das principais commodities produzidas e negociadas no mundo, destacando-se o Brasil como o maior produtor mundial na safra 2022/2023, com uma produção de aproximadamente 156 milhões de toneladas de soja, representando aproximadamente cerca de 42% de toda a produção mundial deste grão, seguido pelos Estados Unidos com uma produção de aproximadamente 116 milhões de toneladas, representando cerca de 31% da produção mundial (USDA, 2023). A produção brasileira de soja está distribuída em aproximadamente 44 milhões de hectares na safra 2022/2023, área cerca de cerca 6,1% superior a safra anterior, apresentando uma produtividade média de 3.507 kg ha<sup>-1</sup>(CONAB, 2023).

A cadeia produtiva da soja movimenta no Brasil cerca de US\$ 100 bilhões/ano distribuídos desde a aquisição de insumos, passando pela produção e finalizando nos processos de logística, comercialização e exportações. Dentre os produtos brasileiros negociados no exterior, o complexo soja é o principal produto exportado, representando cerca de 14,6% do volume total, superando produtos como materiais de transporte, minérios metalúrgicos, petróleo, carnes, açúcar e álcool. Aproximadamente 44% da produção de soja brasileira é destinada à exportação do grão in natura, 7% aos estoques do país e 49% destinam-se ao processamento de farelo (79%) e óleo (21%). As exportações de farelo de soja correspondem a 52% do

total processado no Brasil, sendo o restante destinado ao consumo doméstico como ração animal, suprimindo a produção de aves, suínos, bovinos e peixes. Já o óleo de soja processado no Brasil é em grande parte (77%) para o consumo doméstico como alimentação e biodiesel e cerca de 23% exportado para outros países (APROSOJA, 2018).

## **2.2 Interferência e controle de plantas daninhas na cultura da soja**

A interferência causada pelas plantas daninhas na cultura econômica pode ser direta ou indireta. Dentre as várias formas de interferência direta nas espécies cultivadas, destaca-se o fenômeno da interferência competitiva. Esse mecanismo específico envolve a redução de um ou mais recursos críticos no meio ambiente, como luz, nutrientes ou água. Além disso, outra forma notável de interferência direta é a interferência alelopática. Essa forma de interferência envolve a produção e posterior liberação de compostos químicos por tecidos vivos ou em decomposição. Esses compostos têm o potencial de interferir no crescimento e desenvolvimento de plantas adjacentes (SOUZA; VELINI; MAIOMONI-RODELLA, 2003). A interferência indireta de plantas daninhas está relacionada principalmente aos danos operacionais causados por algumas trepadeiras, como espécies de corda-de-viola (*Ipomoea* spp.) e pelo fato de as plantas serem hospedeiras de pragas e doenças, como plantas de trapoeraba (*Commelina benghalensis*) servindo de abrigo a espécies de percevejo barriga-verde (*Dichelops furcatus*) (BARROSO; MURATA, 2021).

A interferência das plantas daninhas com as culturas agrícolas é estudada em três períodos distintos: o período anterior a interferência (PAI), período crítico de prevenção à interferência (PCPI) e o período total de prevenção à interferência (PTPI). O PAI refere-se ao período em que a convivência entre a cultura e a planta daninha não resulta em perdas significativas em produtividade, sendo desde a emergência da cultura até o início do PCPI, sendo este o momento mais crítico, onde a presença de plantas daninhas competindo pelos mesmos recursos resulta em perdas de produtividade e na qualidade dos grãos (RADOSEVICH; HOLT; GHERSA, 2007). O PTPI compreende ao período total, ou seja, as plantas daninhas que emergirem neste período poderão interferir no desenvolvimento e produtividade das culturas, uma vez que a partir do final do PTPI a própria cultura é capaz de controlar e impedir o crescimento de plantas daninhas, principalmente pelo sombreamento das entrelinhas (PITELLI; DURIGAN, 1984).

A definição dos períodos de interferência é variável para a mesma cultura devido a fatores intrínsecos como sistema de produção, espécies de plantas daninhas e espaçamento de plantio. Rüdell et al. (2021) identificaram um período total de prevenção a interferência para a cultura da soja de 50 dias, sendo o período de 20 a 50 dias após a emergência considerado o período crítico (PCPI). Já Daramola et al. (2022) verificaram que a convivência entre a soja e as espécies *C. benghalensis*, *Euphorbia heterophylla*, *Panicum maximum*, *Digitaria horizontalis* e *Gomphrene celozoides* foi mais crítica nos períodos de 14 a 42 dias após a emergência da cultura. Práticas que permitam um melhor desenvolvimento da cultura e possibilitem a redução do período crítico de interferência, devem ser adotadas, como por exemplo o uso de herbicidas em pré emergência, como o diclosulam e o flumioxazin na cultura da soja, os quais possibilitam o aumento do PAI, permitindo que a cultura feche o dossel antes do período crítico, dificultando a emergência das plantas daninhas (RIZZARDI; ROCKENBACH; SCHNEIDER, 2020).

Os prejuízos causados pela interferência direta são os que mais afetam o produtor, uma vez que a redução na produtividade da cultura é pronunciada quando não há um controle efetivo das espécies. Silva et al. (2015) verificaram a redução de 52% da produtividade da soja quando em competição por recursos vitais com espécies como capim-marmelada (*Urochloa plantaginea*), capim-colchão (*D. horizontalis*), corda-de-violão (*Ipomoea triloba*), leiteiro (*E. heterophylla*), caruru-rasteiro (*Amaranthus deflexus*), trapoeraba (*C. benghalensis*), poaia-branca (*Richardia brasiliensis*), picão-preto (*Bidens pilosa*) e nabiça (*Raphanus raphanistrum*).

No entanto, entre as principais plantas daninhas que afetam as lavouras de grãos no Brasil, destacam-se a buva (*Conyza* spp.) e o capim-amargoso (*Digitaria insularis*). Estudos conduzidos por Gazziero et al. (2013) demonstram que a convivência entre a soja e plantas de *D. insularis* na densidade de 4 a 6 plantas m<sup>2</sup> reduziram 44% a produtividade da soja. Já no caso da interferência isolada de plantas de *Conyza* spp., uma planta m<sup>-2</sup> é capaz de reduzir entre 12 e 14,6% a produtividade da soja (ALBRECHT et al., 2018).

Além dos impactos na redução da produtividade, o aumento no custo de controle destas plantas também é elevado. O custo médio para controle de plantas de *Conyza* spp. em áreas de soja é 32% maior quando há a presença de plantas resistentes ao glyphosate. Em casos de infestação mista de *Conyza* spp. e *D. insularis* resistentes, o custo de controle de plantas daninhas pode ser até 5 vezes maior (ADEGAS, 2017).

Desde a expansão comercial da cultura da soja pelo Brasil, a utilização do método químico para o controle de plantas daninhas tem sido ferramenta chave para o sucesso das lavouras comerciais, devido principalmente a algumas características oferecidas por esta prática, como a eficácia, praticidade e rapidez para o controle das espécies invasoras. Os herbicidas na cultura da soja devem ser utilizados antes do momento da semeadura, visando propiciar condições de ausência de plantas daninhas nos estádios iniciais de estabelecimento da cultura, sendo que aplicações em pós-emergência da cultura são necessárias como forma complementar no manejo das plantas daninhas (MONQUERO, 2014).

Após os avanços da soja geneticamente modificada com resistência ao glyphosate em pós-emergência, a preferência pelo uso de herbicidas pré-emergentes foi reduzida, principalmente pelas características de seletividade e amplo espectro de controle proporcionadas por este herbicida. No entanto, o crescente aumento de espécies com resistência ao glyphosate tem destacado a importância do uso de herbicidas em pré-emergência para o controle das plantas daninhas, principalmente em áreas com a presença de biótipos resistentes (GAZZIERO et al., 2012).

Visando preservar e prolongar a vida útil de algumas moléculas herbicidas, bem como a sustentabilidade do sistema produtivo, o manejo integrado de plantas daninhas se faz necessário. Este sistema é representado pela combinação de métodos, baseando-se em medidas preventivas e métodos de controle. As medidas preventivas estão relacionadas a práticas que minimizem a introdução e disseminação de sementes de plantas daninhas, como por exemplo, a limpeza de máquinas agrícolas antes de trafegarem para novas áreas de operação e a manutenção de áreas periféricas, canais de irrigação e beiras de estradas (ALBRECHT et al., 2021a).

Dentro do manejo integrado de plantas daninhas, destaca-se o método cultural como um dos mais efetivos no controle das plantas daninhas, principalmente devido a capacidade da cultura em desenvolver o dossel e fechar a entrelinha de cultivo de tal modo que o efeito do sombreamento impossibilita o desenvolvimento de espécies daninhas. Dessa maneira, a compreensão deste método com os períodos de interferência é primordial para o sucesso do manejo, uma vez que todas as práticas adotadas para o controle visam prolongar o PAI, possibilitando o fechamento da entrelinha sem a presença de plantas, bem como reduzindo o número de intervenções químicas necessárias para controlar plantas daninhas em pós-emergência. Estas condições podem ser alcançadas através da adoção de práticas que favoreçam o

desenvolvimento da cultura da soja, como a escolha de cultivares adaptadas a região, correção do solo, adubação da cultura conforme exigências nutricionais e o manejo entressafra de plantas daninhas, são exemplos de medidas que irão favorecer o desenvolvimento inicial da cultura, possibilitando um rápido estabelecimento na área e reduzindo o período total de prevenção a interferência (ALBRECHT et al., 2021a).

### 2.3 Biotecnologias na cultura da soja

As biotecnologias embarcadas nas plantas através da transgenia são ferramentas essenciais para a manutenção e expansão dos tetos produtivos das principais culturas agrícolas do país. Atualmente no Brasil, tem-se 112 eventos transgênicos aprovados entre as diferentes culturas, sendo 64 eventos para a cultura do milho (*Zea mays* L.), 23 eventos para o algodão (*Gossypium hirsutum* L.), 3 para cana-de-açúcar (*Saccharum* sp), 1 para o trigo (*Triticum aestivum*), 1 para eucalipto (*Eucalyptus* sp.), 1 para feijão (*Phaseolus vulgaris*) e 19 eventos para a cultura da soja (ISAAA, 2023).

Dentre os 19 eventos aprovados para a cultura da soja no Brasil, 17 destes são eventos de tolerância aos herbicidas, como por exemplo os inibidores da EPSPs (glyphosate), os inibidores da ALS (imidazolinonas e sulfoniluréias), inibidores da glutamina sintetase (glufosinato) e para os mimetizadores de auxina como o 2,4-D e o dicamba (ALBRECHT et al., 2021b). Diante do cenário do manejo integrado de plantas daninhas, os eventos com tolerância a herbicida são excelentes ferramentas na integração dos métodos de controle, uma vez que se deve seguir a recomendação de rotação dos mecanismos de ação dos herbicidas utilizados, consequentemente a possibilidade de rotação dos eventos transgênicos, viabilizando a longevidade das biotecnologias.

Em meio aos eventos transgênicos aprovados no Brasil, destaca-se o evento MON87708, o qual é objeto de estudo do presente trabalho. Este evento, comercialmente registrado como Roundup Ready™ 2 Xtend™, foi aprovado no Brasil em 2016 e confere tolerância a aplicação dos herbicidas glyphosate e dicamba, através da inserção dos genes *cp4 epsps* e *dmo*, respectivamente (ISAAA, 2023).

O gene *dmo* foi obtido a partir da bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*, cepa DI-6 e inserido nas plantas de soja através da metodologia de transformação mediada por *Agrobacterium* sp. Este gene é responsável por expressar a proteína dicamba mono-oxigenase (DMO), a qual confere a resistência ao herbicida dicamba (CTNBIO, 2023). A enzima DMO é capaz de inativar a molécula herbicida antes de alcançar

níveis tóxicos à planta, convertendo-a em ácido 3,6-diclorosalicílico (3,6-DCSA), um composto que não apresenta atividade herbicida (BEHRENS et al., 2007).

Segundo Smith (1974), a molécula de dicamba é prontamente transformada em 3,6-DCSA no solo, através da ação de bactérias presentes no meio, como por exemplo a *S. maltophilia* a qual foi fonte de obtenção do gene *dmo*. Krueger et al. (1989) confirmaram a ação de bactérias isoladas na degradação do dicamba, as quais são capazes de utilizar a molécula herbicida como única fonte de carbono, bem como foi identificado que o metabólito primário formado neste processo é o 3,6-DCSA. Para tanto, o sistema enzimático da bactéria responsável por esta conversão é composto por três componentes catalisadores: redutase, ferredoxina e oxigenase, classificados como dicamba O-dimetilase (HERMAN et al., 2005). O sistema enzimático dicamba O-dimetilase funciona como uma cadeia transportadora de elétrons, uma vez que o NADH atua como doador de elétrons, os quais são transportados através de uma redutase até a ferredoxina e, por fim, ao componente final DMO (BEHRENS et al., 2007).

A tolerância do dicamba em soja geneticamente modificada com o gene *dmo* foi observada por Byker et al. (2013) ao avaliar a eficácia no controle de plantas daninhas após aplicação em pré-plantio de 900 g. ea ha<sup>-1</sup> de glyphosate e 300 g. ea ha<sup>-1</sup> de dicamba, bem como a seletividade na cultura da soja semeada na sequência. Da mesma forma, Underwood et al. (2016) observaram a tolerância ao associar dicamba ao glyphosate em diferentes tratamentos para controle de plantas daninhas em pós-emergência da soja tolerante ao dicamba.

## 2.4 O herbicida dicamba

Os herbicidas auxínicos, como são conhecidos o 2,4-D, MCPA, picloram e dicamba, são moléculas utilizadas mundialmente na agricultura, principalmente para o controle de plantas daninhas eudicotiledôneas. O 2,4-D, por exemplo, foi um dos primeiros herbicidas seletivos desenvolvidos durante o período da segunda guerra mundial, o que levou ao aumento e intensificação do seu uso na agricultura mundial (KIRBY, 1980). O sucesso deste herbicida na agricultura levou a formulação de outros componentes herbicidas posteriormente, como o dicamba (STERLING; HALL, 1997). Desta maneira, herbicidas deste mecanismo de ação foram preferencialmente utilizados na agricultura por mais de 60 anos, principalmente devido a sua eficácia, seletividade e baixos custos de aplicação (MITHILA et al., 2011).

O dicamba (ácido 3,6-dicloro-2-methoxibenzoico) está classificado no grupo “O”, mimetizadores de auxina, segundo a classificação dos mecanismos de ação pelo Comitê de Ação a Resistência aos Herbicidas (HRAC-BR, 2023). Os herbicidas deste grupo atuam no metabolismo de ácidos nucleicos e desbalanço hormonal da planta. Estas moléculas são capazes de alterar a plasticidade celular, pois uma vez absorvidas irão acidificar a parede celular através do estímulo da bomba de prótons da ATPase, logo, este ambiente com menor pH, aumenta a atividade de enzimas responsáveis pelo alongamento e afrouxamento celular. Baixas concentrações destas moléculas estimulam a síntese de RNA polimerase e por consequência, maior síntese de RNA, DNA e proteínas. Todos estes processos desencadeiam uma maior síntese de hormônios vegetais como auxinas e giberelinas, levando a um crescimento desordenado das células (OLIVEIRA JR et al., 2021).

Este herbicida pertencente ao grupo químico do ácido benzóico com elevada solubilidade em água e uma meia vida no solo de aproximadamente 14 dias, sendo utilizado principalmente em pós-emergência para o controle de plantas daninhas de folhas largas (MONACO; WELLER; ASHTON, 2002). Trata-se de uma molécula antiga no mercado, sendo conhecida no Brasil desde 1980, formulado inicialmente como sal dimetilamina (DMA), comercialmente conhecido pelo produto Banvel®. Porém, a formulação DMA apresenta elevados índices de volatilização e deriva, sendo assim um problema devido ao deslocamento de partículas do herbicida para áreas vizinhas, causando injúrias em plantas não alvo. Com isso, novas formulações do herbicida foram desenvolvidas junto ao pacote tecnológico da soja transgênica, obtendo-se a formulação sal diglicolamina (DGA) a qual reduz as perdas por volatilização e deriva durante a aplicação.

A elevada pressão de vapor é uma característica de herbicidas deste mecanismo de ação que se destaca, uma vez que essa particularidade associada a fatores ambientais, contribuem a formação de vapor, levando ao deslocamento do herbicida para plantas não alvo (MONACO; WELLER; ASHTON, 2002). A combinação entre a formação de vapor e a sensibilidade de plantas não transgênicas, mesmo em baixas concentrações, resulta em um aumento no risco da utilização destes herbicidas. Hartzler (2017) relata que enquanto são necessários 1% da dose de glyphosate para causar injúrias visíveis em milho sensível, apenas 0,005% da dose de dicamba é capaz de causar injúrias em soja não tolerante.

No entanto, o potencial de volatilização do dicamba pode variar de acordo com as condições de aplicação, como a temperatura, uma vez que temperaturas mais elevadas aumentam o potencial de volatilização desta molécula, bem como a superfície de aplicação. Behrens; Lueschen, (1979) observaram maior volatilização de dicamba em folhas de milho e soja, quando comparado a volatilizada a partir do solo. Carbonari et al. (2020) também verificaram importante influência da superfície de aplicação na produção de vapor, uma vez que a aplicação de dicamba (DGA) isolado em solo úmido, apresentou maior produção de vapor quando comparado com solo seco ou em solo com palha.

O dicamba é um ácido fraco, com pKa de 1,87, formulado com sal, sendo a forma ácida volátil (BEHRENS; LUESCHEN, 1979). No entanto, com o advento dos eventos transgênicos com tolerância ao dicamba, novas formulações foram desenvolvidas e estudadas, visando a redução do potencial de volatilização desta molécula. Inicialmente, o herbicida dicamba era comercializado na formulação com base no sal de dimetilamina (DMA), o qual apresenta taxas de volatilização superiores a atual formulação baseada em sal de diglicolamina (DGA). As novas formulações, associadas a redutores de volatilidade, como o ácido acético conhecido como VaporGrip®, reduzem significativamente os problemas com volatilização, uma vez que esta tecnologia impede a formação de dicamba em sua forma ácida na calda de aplicação, impossibilitando a associação da molécula herbicida com as moléculas de hidrogênio (BAYER CROPSCIENCE, 2021).

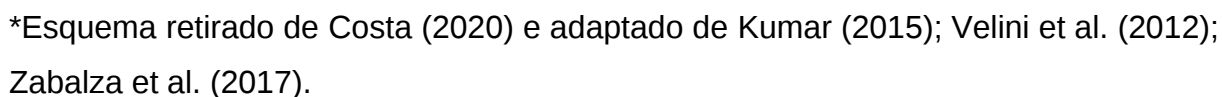
A resistências de plantas daninhas aos herbicidas é um dos principais desafios dentro do manejo, uma vez que a pressão de seleção é um dos principais fatores para a seleção de plantas daninhas resistentes e isso se dá pelo uso contínuo e prolongado de um mesmo herbicida ou de um mesmo mecanismo de ação. Porém, o número de casos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas auxínicos é relativamente baixo, são 83 casos no mundo todo envolvendo herbicidas mimetizadores de auxina, incluído casos de resistência múltipla, quando há resistência a herbicidas de mecanismos de ação diferentes (HEAP, 2023). Algumas teorias para estes casos, estão relacionados a mutação de vários locus para que ocorra a resistência, dificultando o estabelecimento e propagação desta característica em plantas daninhas (GRESSEL; SEGEL; LEBARON, 1982). No entanto, alguns autores refutam esta teoria, uma vez que os casos identificados de resistência de plantas daninhas aos auxínicos, são características governadas por um único gene, apontando que o menor número de

casos de resistência está relacionado a baixa ocorrência de alelos resistentes nas populações, ou ainda que a mutação necessária para conferir a resistência possa ser letal (JASIENIUK; MAXWELL, 1994; MITHILA et al., 2011).

No Brasil há 4 casos de resistência envolvendo herbicidas auxínicos, porém são casos que envolvem resistência ao 2,4-D e ao quinclorac, sendo resistência simples e múltipla de *Echinochloa crus-galli* var. *crus-galli* ao quinclorac e resistência múltipla de *Conyza sumatrensis* ao 2,4-D. Não há relatos de espécies de plantas daninhas com resistência ao dicamba no Brasil, no entanto tem-se 20 casos de resistência envolvendo este herbicida no mundo em países como EUA, Argentina, Canada e Australia, para espécies como o *Amaranthus palmeri*, *Amaranthus hybridus* e *Kochia scoparia* (HEAP, 2023).

## 2.5 Resistência Sistêmica Adquirida (SAR)

A resistência sistêmica adquirida (SAR) é um mecanismo desenvolvido pela planta a qual induz seu sistema de defesa, visando proteger contra o ataque de patógenos ou mesmo contra o estresse a fatores abióticos (DURRANT; DONG, 2004). A ativação da resistência sistêmica adquirida nas plantas parte de uma série de sinais sistêmicos que desencadeiam o efeito protetivo, sendo um possível sinalizador o ácido salicílico, uma vez que verifica-se aumento nos níveis deste hormônio nas folhas quando a planta é submetida ao contato com patógenos como fungos, bactérias e vírus (DURNER; SHAH; KLESSIG, 1997). Alguns autores sugerem que a sinalização ocorre através da conversão de ácido salicílico em um composto volátil, o qual é capaz de induzir a resistência não só da planta afetada, mas também em plantas que estão próximas a ela (SHULAEV; SILVERMAN; RASKIN, 1997). O ácido salicílico é sintetizado a partir de uma série de reações na rota do ácido chiquímico (Figura 1), podendo ser via fenilalanina, através da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) ou a partir de isocorismato (KUMAR, 2015; VELINI et al., 2012).



O metabólito 3,6-DCSA possui efeito análogo ao ácido salicílico, demonstrando o aumento da resistência de plantas após o tratamento com o composto ou com o herbicida dicamba em plantas que possuem o gene *dmo*. Bhatti; Feng; Pitkin, (2014), observaram, por exemplo, que plantas de algodão reduziram a infecção pelo fungo *Pythium ultimum* quando tratadas com 3,6-DCSA 24h antes da inoculação do fungo

na planta. Este efeito protetor foi observado pelos mesmos autores para a infecção pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *Malvacearum*.

Plantas que possuem o gene *dmo* apresentaram melhorias em sua sanidade após a aplicação de dicamba, verificando que o metabolito 3,6-DCSA possui efeitos benéficos a planta. Entre estes benefícios verificados, destaca-se o aumento na resistência contra estresse bióticos e abióticos como a tolerância a seca, estresse oxidativo e resistência a doenças. De maneira geral, observa-se que o metabolito proveniente da degradação do dicamba é capaz de induzir uma resposta imediata através da resistência sistêmica adquirida (BHATTI; FENG; PITKIN, 2014).

Outro ponto observado com relação ao comportamento do metabolito 3,6-DCSA em plantas de soja foi o aumento da resistência à estresse oxidativo. As plantas com o gene *dmo*, receberam a aplicação de dicamba 24 horas antes da aplicação de subdoses de paraquat, a fim de induzir o estresse oxidativo, já plantas sem o gene *dmo* receberam a aplicação de 3,6-DCSA no mesmo período. Após 4 dias do tratamento com paraquat (30 g i.a ha<sup>-1</sup>) as plantas que receberam a aplicação prévia de dicamba apresentaram até 50% de redução de injúria visual com relação as plantas que não receberam dicamba previamente e plantas tratadas apenas com 3,6-DCSA, demonstraram redução de até 44% de injúria (BHATTI; FENG; PITKIN, 2014).

O ácido salicílico é capaz de mitigar injúrias provenientes de estresses abióticos sofridos pelas plantas, como toxidez por metais pesados (FARAZ et al., 2020; ZANGANEH; JAMEI; RAHMANI, 2019), estresse por baixas temperaturas (IGNATENKO et al., 2019) e toxidez por herbicidas (KAYA; YIGIT, 2014; LIANG; LU; YANG, 2012; YIGIT et al., 2016). As injúrias sofridas por plantas de trigo provenientes da aplicação de herbicidas inibidores do fotossistema II, como o isoproturon, foram mitigadas a partir da aplicação exógena de ácido salicílico, uma vez que este composto melhorou a atividade do sistema antioxidante das plantas, potencializando a degradação do herbicida (LIANG; LU; YANG, 2012; LU et al., 2015).

Li et al. (2020) verificaram que o pré-tratamento de plântulas de soja com ácido salicílico permitiu reduzir a toxidez proveniente da aplicação de halosulfuron-methyl, um inibidor da enzima acetolactato sintase (ALS), através do aumento da atividade de enzimas antioxidantes como a glutathione redutase (GR) e ascorbato peroxidase (APX), possibilitando o aumento da assimilação de CO<sub>2</sub>, conteúdo de clorofila e taxa de transporte de elétrons.

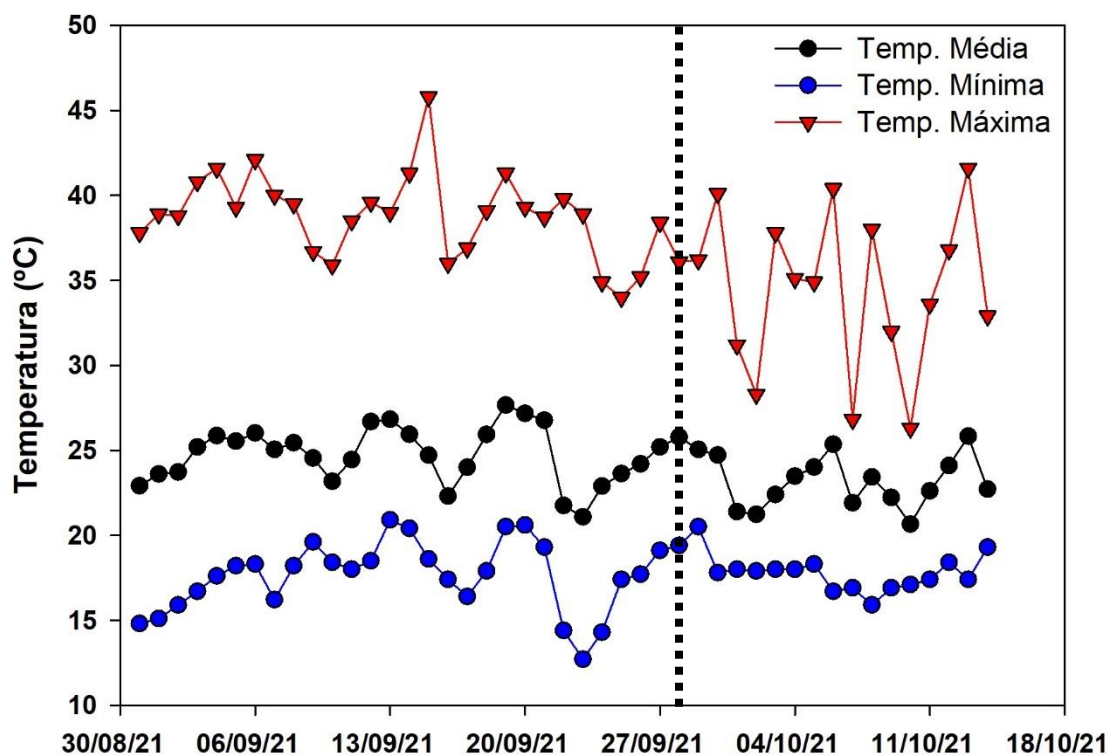
Desta forma, faz-se necessário o entendimento da dinâmica da molécula de 3,6-DCSA em plantas de soja, bem como os efeitos desencadeados após a aplicação deste composto na fisiologia e metabolismo da planta.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos em casa de vegetação no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM), pertencente ao Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, campus de Botucatu, SP.

As unidades experimentais foram compostas por vasos com capacidade de 0,7 litros, preenchidos com substrato Carolina® composto por turfa de esfagno, vermiculita e casca de arroz carbonizada, com pH 5,7 ( $\pm 0,5$ ). Foram semeadas 5 sementes por vaso, e após a emergência, foi realizado desbaste permanecendo duas plantas viáveis de soja por vaso. As plantas foram mantidas em bancadas com uma lâmina de água de aproximadamente 3 cm para manutenção e uniformização da umidade entre as unidades experimentais e conduzidas sob condição de plena luz antes e após a aplicação dos tratamentos. A temperatura máxima, mínima e média monitoradas durante a condução dos estudos estão presentes na figura 2:

**Figura 2 - Temperatura mínima, máxima e média durante o período de condução dos ensaios em casa de vegetação em Botucatu, SP**



\* A linha tracejada indica a data de aplicação dos experimentos

Dois experimentos foram conduzidos para as análises de trocas gasosas, compostos pelas cultivares de soja (DMO – 1 e DMO – 2) com características semelhantes (grupo de maturação 6.4), codificadas e todas com a presença do gene *dmo*, diferindo apenas a presença ou ausência das proteínas que conferem resistência ao ataque de insetos. Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizados (DIC) com 4 tratamentos, sendo dicamba, 3,6-DCSA, ácido salicílico e uma testemunha, em cinco repetições. Todos os compostos foram aplicados na dose única de 720 g e.a ha<sup>-1</sup>. Os tratamentos com ácido salicílico e 3,6-diclorosalicílico foram aplicados com os respectivos produtos técnicos, enquanto o tratamento com dicamba foi aplicado com o produto comercial Atectra® (480 g L<sup>-1</sup>) na dose de 1,5 L ha<sup>-1</sup>. As aplicações dos tratamentos ocorreram quando as plantas atingiram o estágio fenológico de V3, realizadas dia 29/09/2021 e indicadas pela linha tracejada (Figura 2), sendo realizadas através de um pulverizador, instalado em uma sala de aplicação fechada com pressão advinda de ar comprimido equipado com quatro pontas XR 110.02, espaçadas entre si por 0,5 m e posicionadas a 0,5 m de altura em relação às plantas, com pressão constante de 2 bar e uma velocidade de deslocamento de 1 m s<sup>-1</sup>, gerando um volume de calda de 200 l ha<sup>-1</sup>.

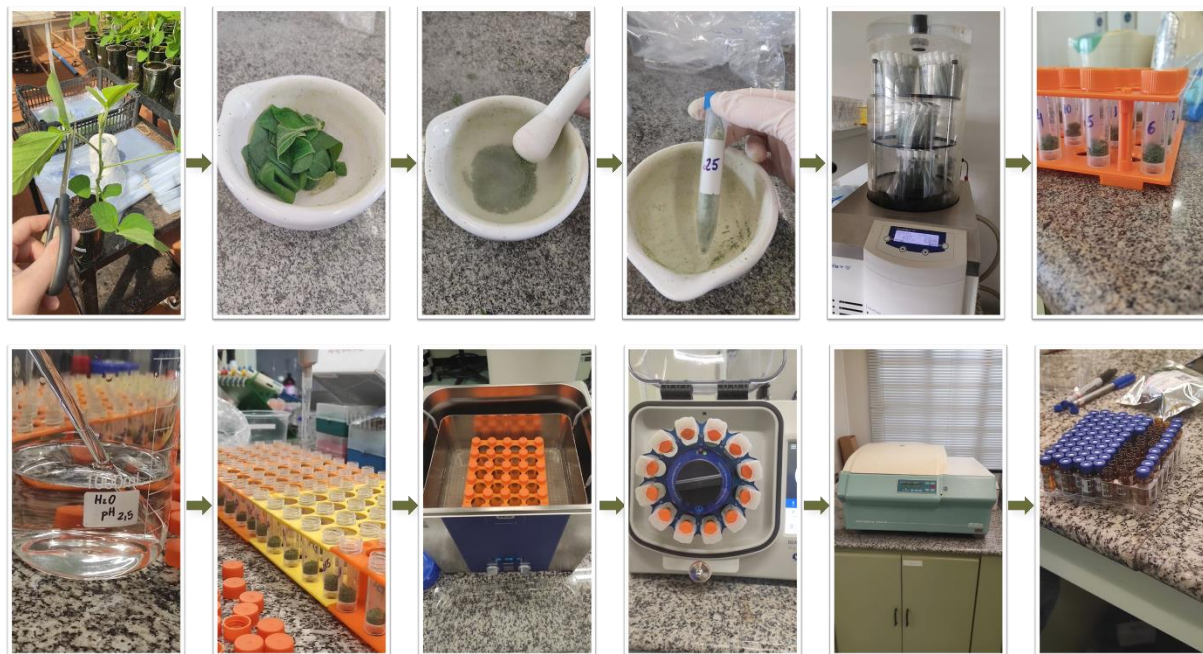
As plantas foram avaliadas quanto as trocas gasosas com 4, 72, 168 e 336 horas após a aplicação (HAA) através de um analisador de gases a infravermelho (IRGA, modelo portátil Lcpro-SD, ADC Bioscientific®), utilizando radiação fotossinteticamente ativa (PAR) constante (1000 µmol fótons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), concentração atmosférica de CO<sub>2</sub>, temperatura e umidade ambiente. Com isso, foram obtidas as variáveis: taxa de assimilação líquida do CO<sub>2</sub> (A), condutância estomática (gs), taxa transpiratória (E) e concentração interna de carbono (Ci) e calculou-se a eficiência do uso da água (EUA) a partir da razão A/E e a eficiência de carboxilação (EC) através da razão A/Ci.

Amostras de plantas foram coletadas com 4, 24, 72, 168 e 336 HAA para avaliações dos teores de dicamba, 3,6-DCSA, ácido salicílico e os compostos da rota do ácido chiquímico. Para tanto, as amostras foram coletadas, pesadas, lavadas com água destilada e acondicionadas em temperatura de -80°C até seu processamento. Para isso, as amostras foram maceradas com nitrogênio líquido e alocadas em um liofilizador para retirada da umidade através do vácuo durante 72h. Posteriormente, cada amostra foi pesada alíquotas de 100 mg para o procedimento de extração dos compostos desejados.

Para a extração dos compostos analisados utilizou-se a cultivar DMO – 1. Para a análise da rota do ácido chiquímico, adicionou-se 5 ml da solução extratora composta por água acidificada (pH 2,5) e levou-se as amostras ao banho de ultrassom durante 30 minutos a 50°C. Posteriormente, o material foi homogeneizado durante 1 minuto a uma velocidade de 4 m s<sup>-1</sup> e levadas para centrifugação durante 5 minutos a uma rotação de 5000 rpm. Posteriormente, coletou-se o sobrenadante, o qual foi alocado em um novo tubo falcon de 15 mL.

Para a extração de dicamba e 3,6-DCSA, adicionou-se 5ml de fase metanol: água (80:20) aos tubos extraídos, agitou-se no homogeneizador durante 1 minuto a uma velocidade de 4 m s<sup>-1</sup> e levou-se para centrifugação durante 5 minutos a uma rotação de 5000 rpm. O sobrenadante foi coletado e adicionado ao mesmo tubo falcon da amostra correspondente da primeira parte do processo de extração. Em seguida, o material extraído foi homogeneizado e filtrado em vials de 1,5 ml através de filtros Millipore de 0,45 µm para análises cromatográficas em LC/MS/MS.

**Figura 3 - Sequência esquemática do processo de coleta e extração das amostras para análise dos compostos em cromatografia**



Para a determinação dos componentes da rota do ácido chiquímico (AMPA, ácido caféico, ácido quínico, ácido chiquímico, ácido cumárico, ácido salicílico, ácido felúrico, ácido clorogênio além dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano), foi utilizado o sistema LCMS/MS composto por um Cromatógrafo Líquido de Alta

Eficiência (HPLC), Shimadzu, modelo Proeminence UFLC, que combina análise ultrarrápida e excelente performance de separação, com alta confiabilidade de resultados; equipado com duas bombas LC20AD, auto injetor SIL-20AC, degazeificador DGU-20A5, sistema controlador CBM20A (permite a operação totalmente automatizada) e forno CTO-20AC (para controle da temperatura da coluna). Acoplado ao HPLC está o espectrômetro de massas 4500 (Applied Biosystems) híbrido triplo quadrupolo. As condições cromatográficas estão presentes na Tabela 1 e as informações dos compostos analisados na Tabela 2.

**Tabela 1 - Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação dos compostos analisados**

|                             |                                                                                                                                                      |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Coluna</b>               | Kinetex 2.6 $\mu$ m Phenyl-Hexyl 100A 100x2.1 mm<br>(Phenomenex)                                                                                     |
| <b>Fluxo</b>                | 0,4 ml min <sup>-1</sup>                                                                                                                             |
| <b>Volume de injeção</b>    | 10 $\mu$ l                                                                                                                                           |
| <b>Temperatura do Forno</b> | 50°C                                                                                                                                                 |
| <b>Fase Móvel</b>           | Fase (A): Água com 0.1% ácido fórmico,<br>Fase (B): Metanol com 0.1% ácido fórmico                                                                   |
| <b>Gradiente</b>            | Inicial 60% Fase (A) e 40% Fase (B)<br>1 min = 40% Fase (B)<br>3 min = 95% Fase (B)<br>6 min = 95% Fase (B)<br>8 min = 40% Fase (B)<br>11 min = Stop |
| <b>Tempo de corrida</b>     | 11 minutos                                                                                                                                           |

**Tabela 2 - Massa molecular e íons secundários dos compostos analisados**

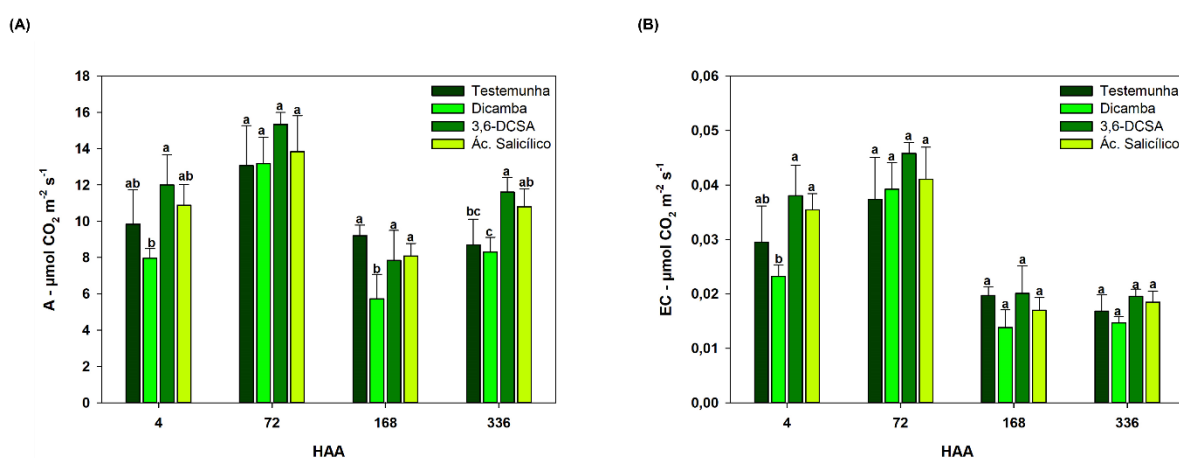
| <b>Composto</b>                | <b>Massa Molecular</b> | <b>Íons Secundários<br/>(Fragmentos)</b> |
|--------------------------------|------------------------|------------------------------------------|
| <b>Dicamba</b>                 | 219.069                | 174.80                                   |
|                                | 221.000                | 176.95                                   |
| <b>3,6 - diclorosalicílico</b> | 205.00                 | 161.15                                   |
|                                | 205.00                 | 125.10                                   |

Todos os dados foram testados quanto a normalidade através do teste de Shapiro-Wilk, posteriormente feito a análise de variância (ANOVA) e quando significativos, submetidos ao teste de média tukey a 5% de probabilidade através do software Sisvar® e os gráficos plotados no software SigmaPlot®. Os resultados referentes a trocas gasosas dos dois experimentos foram analisados de forma conjunta.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes as trocas gasosas são apresentadas como a média das duas cultivares *dmo*. As análises em diferentes períodos, demonstram diferenças estatística entre os tratamentos para alguns dos períodos de avaliação, podendo ser observados na figura 6.

**Figura 4 - Assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A) e eficiência de carboxilação (EC) (B) de plantas de soja com o gene *dmo* submetidas a aplicação de diferentes tratamentos em pós-emergência**



- Letras minúsculas iguais entre os tratamentos dentro de um mesmo período de avaliação, não diferem entre si pelo teste tukey ( $p \leq 0,05$ ). Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ( $p \leq 0,05$ ).

As taxas de fotossíntese das plantas de soja demonstram diferenças significativas entre os tratamentos após 4 horas da aplicação (Figura 6A). Apesar da resistência da soja ao dicamba, verifica-se reduções significativas das taxas de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> quando o herbicida é aplicado em pós-emergência da cultura. Ao compararmos as diferenças entre dicamba e a aplicação do seu metabólito 3,6-DCSA, o qual não apresenta efeito herbicida, verifica-se redução de aproximadamente 34% na atividade fotossintética. No entanto, esta diferença não é expressiva quando se avalia dicamba e a testemunha (sem aplicação).

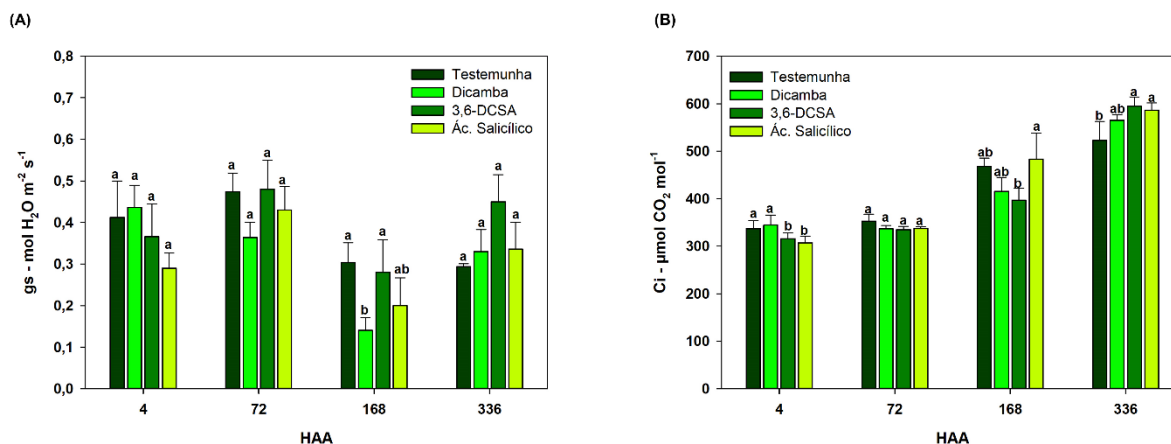
Este comportamento foi verificado novamente aos 7DAA e 14DAA, uma vez que aos 7 dias após a aplicação, o uso de dicamba diferiu significativamente dos demais tratamentos, reduzindo cerca de 38% da atividade fotossintética neste período quando comparado com a testemunha. Aos 14 DAA, é possível observar que as plantas que receberam o tratamento à base de dicamba, ainda demonstravam menores taxas fotossintéticas, principalmente quando comparado com ácido salicílico

e 3,6-DCSA. Com relação ao efeito de 3,6-diclorosalicílico, observa-se para este período de avaliação, um incremento significativo na assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, diferindo das plantas com dicamba e das plantas não tratadas (testemunha). Após 14 dias, as plantas que receberam apenas a aplicação de 3,6-DCSA apresentaram um incremento de 34% na fotossíntese, quando comparado com a testemunha. Esse incremento chegou próximo a 40% comparando com as plantas que receberam a aplicação de dicamba. Apesar de maior, 3,6-DCSA não diferiu neste período para a aplicação do ácido salicílico, apresentando efeitos similares ao longo dos períodos de avaliação.

A eficiência de carboxilação das plantas de soja comportou-se de forma diferencial com relação aos tratamentos 4 HAA (Figura 6B). Nesta avaliação, observa-se que as aplicações de 3,6-DCSA e ácido salicílico, não diferiram entre si ou com relação a testemunha, porém diferem com relação ao uso do dicamba. Nesta ocasião, a aplicação de 3,6-DCSA foi cerca de 64% superior ao tratamento com dicamba, dando indícios de que 4 horas após a aplicação, ainda há maiores concentrações de dicamba do que seu metabólito.

A condutância estomática das plantas de soja foi variável de acordo com o período de avaliação (Figura 7A). Identificou-se diferenças entre os tratamentos apenas no período de 7 DAA, onde as plantas tratadas com dicamba apresentaram menor abertura dos estômatos no período avaliado, corroborando com os dados de taxa fotossintética para o mesmo período, demonstrando que a presença do herbicida em plantas de soja com o gene *dmo*, pode levar a uma redução na abertura dos estômatos. Para as condições deste estudo, observou-se uma redução na condutância estomática de 54% para o tratamento com dicamba comparando-o com a testemunha (sem aplicação), indicando um dos primeiros sintomas a partir da aplicação de herbicidas auxínicos, uma vez que podem induzir a síntese de etileno e ácido abscísico (TAIZ; ZEIGER, 2017). No entanto, esta diferença não foi verificada nas concentrações internas de CO<sub>2</sub> para o mesmo período de avaliação (Figura 7B). Diferenças significativas foram constatadas após 4 horas da aplicação dos tratamentos nos teores internos de CO<sub>2</sub>, uma vez que a aplicação de 3,6-DCSA e de ácido salicílico apresentaram os menores teores com relação a testemunha e dicamba.

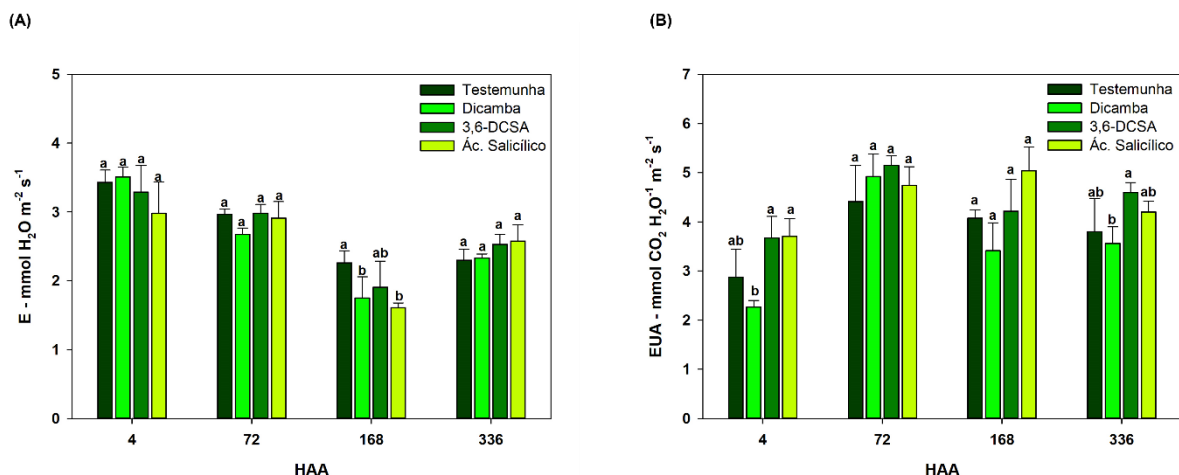
**Figura 5 - Condutância estomática (gs) (A) e concentração interna de CO<sub>2</sub> (Ci) (B) de plantas de soja com o gene dmo submetidas a aplicação de diferentes tratamentos em pós-emergência**



- Letras minúsculas iguais entre os tratamentos dentro de um mesmo período de avaliação, não diferem entre si pelo teste tukey ( $p \leq 0,05$ ). Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ( $p \leq 0,05$ ).

As plantas responderam de forma diferencial aos tratamentos aos 168 HAA para a avaliação da taxa de transpiração (Figura 8). A resposta das plantas de soja foi similar para condutância estomática para o mesmo período. Observou-se menor abertura dos estômatos para o tratamento com dicamba, refletindo em menores taxas de transpiração (Figura 8A). Com relação a eficiência no uso da água, com 4 HAA as plantas que receberam dicamba apresentaram 21% menor eficiência comparado com a testemunha, no entanto não diferiram estatisticamente (Figura 8B). Os tratamentos a base de 3,6-DCSA e ácido salicílico foram superiores estatisticamente ao tratamento com dicamba, 62% e 63%, respectivamente. Aos 14 DAA este comportamento repetiu-se, demonstrando diferenças entre a aplicação de 3,6-DCSA isolado e de dicamba, sendo o 3,6-DCSA cerca de 21% superior ao dicamba.

**Figura 6 – Taxa de transpiração (E) (A) e eficiência no uso da água (EUA) (B) de plantas de soja com o gene dmo submetidas a aplicação de diferentes tratamentos em pós-emergência**



- Letras minúsculas iguais entre os tratamentos dentro de um mesmo período de avaliação, não diferem entre si pelo teste tukey ( $p \leq 0,05$ ). Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ( $p \leq 0,05$ ).

As plantas possuem um complexo enzimático responsável por reduzir os efeitos causados por estresses oxidativos, como estresse por calor, seca ou herbicidas que possam formar espécies reativas de oxigênio (EROs) em excesso, além de moléculas sinalizadoras que possibilitam a sobrevivência destas plantas em condições de estresse, como o ácido jasmônico e o ácido salicílico, os quais estão relacionados ao mecanismo de defesa das plantas (DELANEY et al., 1994; LI et al., 2011).

Li et al. (2020) verificaram que a aplicação exógena de ácido salicílico em plantas de soja foi capaz de reduzir os efeitos deletérios causados pela intoxicação do herbicida halosulfuron-methyl, além de apresentar ganhos no desempenho fotossintético. Os autores verificaram 19% de incremento nas taxas de fotossíntese de plantas de soja ao receberem a aplicação exógena de ácido salicílico em condições sem estresse. O efeito desencadeado pela aplicação do herbicida reduziu a taxa fotossintética em 69% comparado com a testemunha, no entanto quando houve o pré-tratamento com ácido salicílico a redução da fotossíntese foi de 52% (LI et al., 2020).

O composto 3,6-diclosalicílico apresenta um comportamento análogo ao ácido salicílico, observando-se para ambos os tratamentos neste estudo, um incremento na assimilação líquida de CO<sub>2</sub> após 7 dias da aplicação quando comparados à aplicação de dicamba. Este incremento pode estar relacionado à maior abertura estomática da

planta neste período, indicando que compostos salicilatos podem atuar na abertura e fechamento estomático (PARASHAR et al., 2014).

Khan; Prithiviraj; Smith, (2003) verificaram comportamento similar no aparato fotossintético de plantas de milho e soja quando submetidas a aplicação de compostos salicilatos. Os autores relatam incrementos na assimilação líquida de CO<sub>2</sub> a partir de 48 horas após a aplicação de ácido salicílico, ácido acetilsalicílico (ASA) e ácido gentísico (GTA). No entanto, o incremento fotossintético gerado pela aplicação destes compostos fenólicos foi acompanhado de um leve aumento ou nenhuma alteração dos níveis de condutância estomática e nas taxas de transpiração, porém, os níveis intercelulares de CO<sub>2</sub> foram ligeiramente menores do que as plantas controle, sugerindo que o incremento na fotossíntese a partir da aplicação de compostos salicilatos está relacionada ao aumento na absorção de CO<sub>2</sub> a nível do cloroplasto e não apenas relacionado a uma maior condutância estomática.

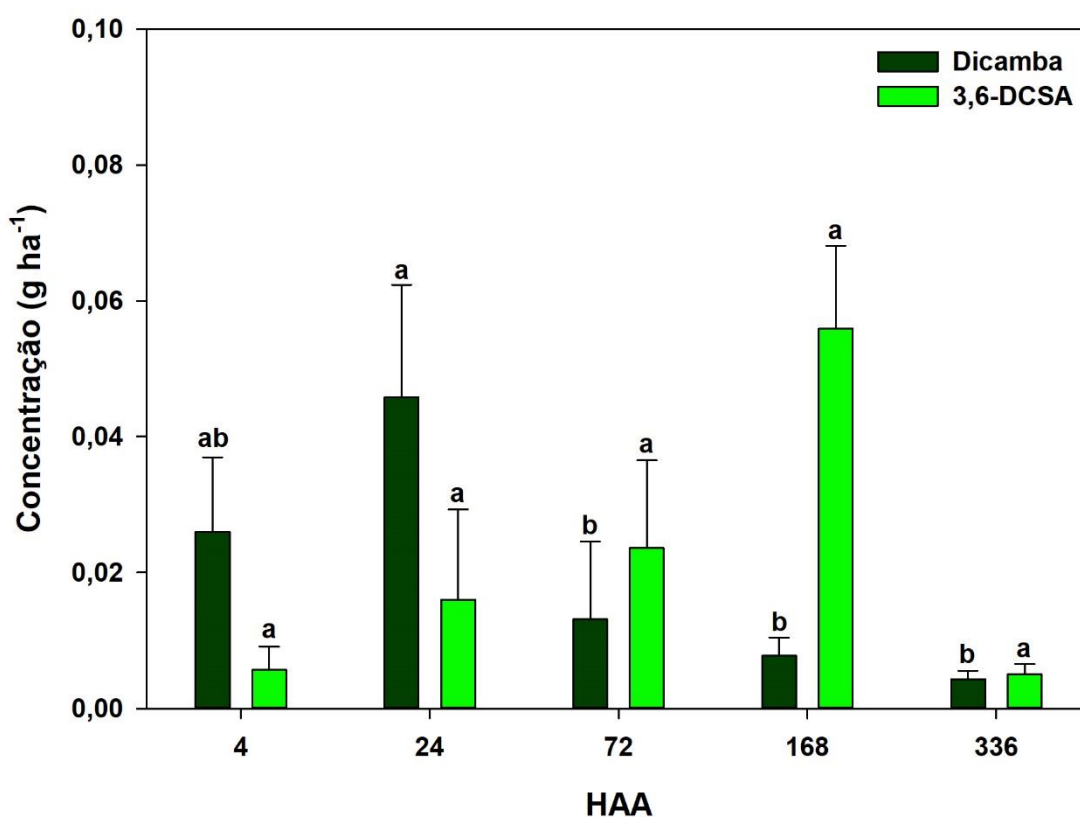
Neste estudo, pode-se observar que a aplicação de 720 g.e.a ha<sup>-1</sup> de dicamba nas plantas de soja com o gene *dmo*, possivelmente resultou em leves níveis de estresse nas plantas, perceptíveis pela redução da taxa fotossintética em alguns períodos quando comparado com o tratamento controle. Comportamento similar aos trabalhos de Khan; Prithiviraj; Smith, (2003) foram observados neste estudo após 4 horas da aplicação dos tratamentos, onde as aplicações com 3,6-diclorosalicílico e ácido salicílico resultaram no incremento da assimilação de CO<sub>2</sub>, porém não foi perceptível grandes aumentos na condutância estomática e nas taxas transpiratórias. Entretanto, para o mesmo período de avaliação, percebe-se menor eficiência no uso da água pelas plantas aplicadas com dicamba, devido às maiores taxas de transpiração e condutância estomática no período.

De maneira geral, pode-se perceber efeitos negativos sobre o desempenho fotossintético de plantas geneticamente modificadas com resistência ao dicamba, quando estas recebem a aplicação do herbicida em pós-emergência. Vale ressaltar que não há recomendação para aplicação deste herbicida na modalidade de pós-emergência para a cultura da soja, mesmo com o gene *dmo*, sendo aplicado nestes estudos apenas com a finalidade de pesquisa e avaliação dos efeitos desencadeados pela metabolização do dicamba e sua transformação em 3,6-DCSA. O uso isolado do 3,6-diclorosalicílico não apresenta efeitos negativos nas plantas e assemelha-se aos efeitos desencadeados pelo uso do ácido salicílico, principalmente para as avaliações de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> e eficiência de carboxilação. Observou-se com as

avaliações de trocas gasosas uma resposta variável de acordo com o período de observação.

Os teores de dicamba e de 3,6-diclorosalicílico foram avaliados para todos os momentos de coleta (4, 24, 72, 168, 336 HAA), sendo possível verificar a eficiência da biotecnologia em degradar o herbicida dicamba em 3,6-DCSA (Figura 9). Os valores são referentes a cultivar DMO-1.

**Figura 7 – Teores de dicamba e 3,6-DCSA em plantas de soja (DMO-1) com o gene *dmo* submetidas a aplicação de dicamba em pós-emergência**



- Letras iguais entre as datas de avaliação dentro do mesmo composto, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ( $p \leq 0,05$ ).

As plantas de soja com o gene *dmo* mostraram-se eficientes na degradação do dicamba. Após 4h da aplicação de dicamba, detectou-se maiores concentrações do herbicida em relação ao seu metabólito 3,6-DCSA nas proporções de 83,5% dos teores detectados sendo dicamba e 16,5% diclorosalicílico. O momento de coleta em que os maiores teores de dicamba foram detectados foi após 24h da aplicação do herbicida. Na ocasião, 73% do teor foi correspondente ao auxínico e 27% ao 3,6-

DCSA, demonstrando incrementos na degradação do herbicida após um dia da aplicação. No entanto, as concentrações internas de dicamba nas plantas de soja após 24h da aplicação do herbicida, foram inferiores a 0,05 g ha<sup>-1</sup>.

Os valores encontrados nas análises cromatográficas demonstraram que a inversão nas concentrações de dicamba e 3,6-DCSA deu-se após 3 dias da aplicação, uma vez que neste momento foram detectados maiores concentrações do metabólito do que do próprio herbicida na proporção de 65% diclorosalicílico e 35% dicamba. Este comportamento manteve-se para a avaliação de 7 DAA, onde verificou-se as maiores concentrações do metabólito. Neste momento, a proporção do metabólito com relação ao dicamba chegou a 91% para 3,6-DCSA e 9% dicamba. Com 14 dias após a aplicação do herbicida, os teores encontrados nas plantas de soja foram inferiores com relação as demais épocas de avaliação, indicando que possivelmente há outros processos envolvidos na degradação do herbicida após a conversão em 3,6-DCSA. Os resultados indicam rápida degradação do herbicida dicamba pela biotecnologia.

O aumento gradativo nos teores de 3,6-DCSA e a redução nos teores de dicamba era esperado, uma vez que estudos na literatura já demonstram que o primeiro produto da degradação do herbicida dicamba é o 3,6-diclorosalicílico, logo o aumento nas concentrações deste metabólito indica eficiência da biotecnologia na degradação do herbicida (CORK; KRUEGER, 1991; KRUEGER et al., 1989). A degradação do dicamba em DCSA se dá pela ação conjunta de um complexo de enzimas formadas pela expressão do gene *dmo*, conhecido como O-dimetilase, o qual é formado por uma redutase, ferredoxina e oxigenase (HERMAN et al., 2005). Estes componentes do complexo enzimáticos foram isolados e detectados por cromatografia, indicando a ação conjunta destes compostos no processo de desmetilação do dicamba (YANG et al., 1994).

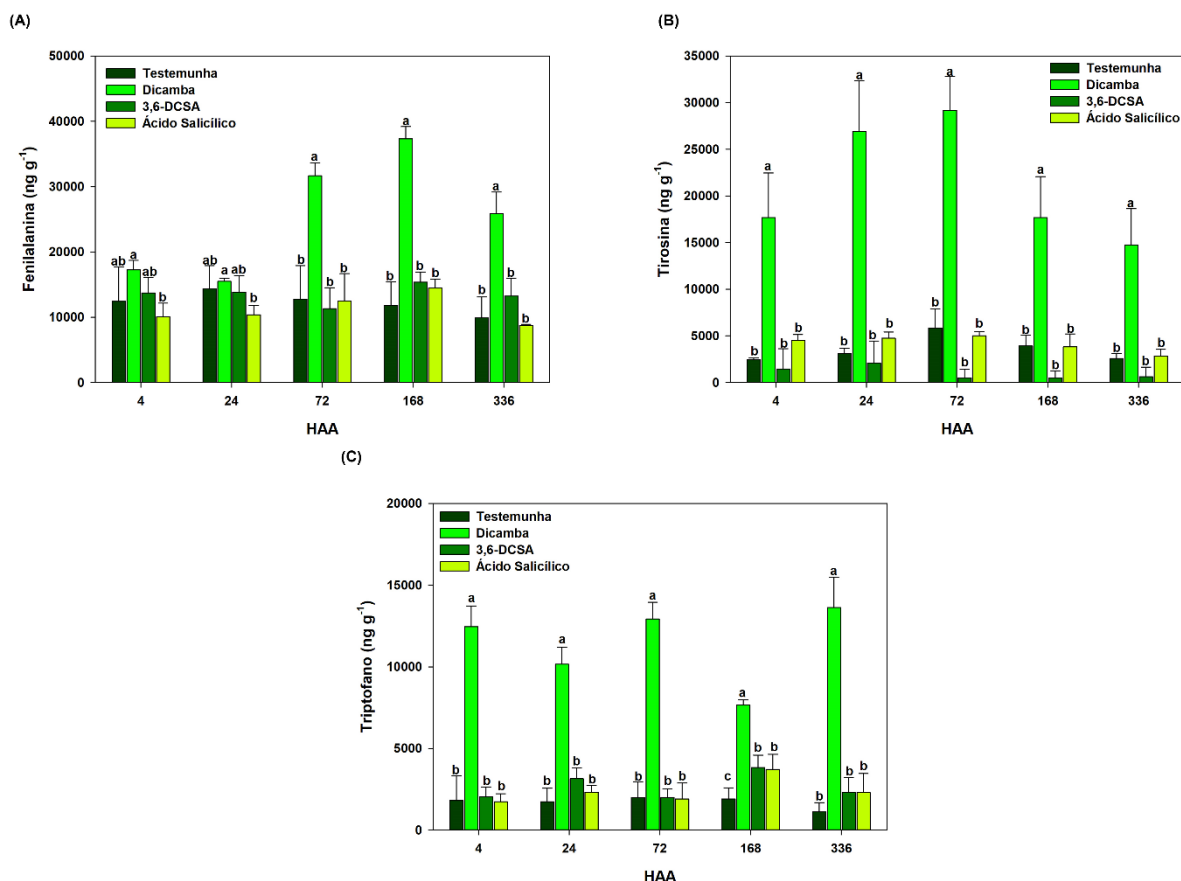
Wang et al., (1997) observaram que este processo de degradação do dicamba ocorre apenas em ambientes aeróbicos, uma vez que os resultados demonstram que em condições de anaerobiose, não há conversão de dicamba em DCSA dentro de 1 hora. Porém, quando as amostras permaneceram em ambiente sem a presença de oxigênio por 30min e posteriormente foram expostas em condições aeróbicas, há significativa conversão de dicamba em DCSA, comprovando a dependência do processo de degradação do dicamba por oxigênio e confirmando que um dos componentes do complexo enzimático é uma oxigenase.

A formação enzimática com três componentes da O-dimetilase apresenta eficiência apenas quando há a presença de todas as proteínas atuando de forma conjunta. Quando cada componente foi avaliado de forma isolada, não apresentaram atividade enzimática significativa. Há influência de outros cofatores no processo de degradação de dicamba, principalmente de NADH e NADPH os quais suportam o processo de degradação, porém NADH mostra-se mais efetivo do que NADPH. A molécula de magnésio ( $Mg^{2+}$ ) é outro cofator necessário para a conversão de dicamba em DCSA, uma vez que a ausência de  $Mg^{2+}$  reduz em 99,3% a atividade enzimática, demonstrando sua essencialidade no processo, assim como NADH, o qual reduziu 92% quando ausente (BEHRENS et al., 2007; WANG et al., 1997).

A detecção de concentrações inferiores de DCSA aos 14 DAA de dicamba pode indicar que há outros metabólitos envolvidos no processo de degradação após a conversão de dicamba em DCSA. Li et al. (2018) identificaram e propuseram que a degradação de 3,6-DCSA em bactérias *Rhizorhabdus dicambivorans* é catalisada por componentes do citocromo P450 monoxigenase, responsáveis pela hidroxilação de 3,6-DCSA, convertendo-o em 3,6-diclorogentisato (3,6-DCGA).

Tendo em vista a ação do 3,6-DCSA de forma análoga ao ácido salicílico, avaliou-se os compostos da rota do ácido chiquímico, rota esta responsável pela síntese do ácido salicílico, visando avaliar a relação e influência do diclorosalicílico nesta rota, bem como o comportamento da planta após a aplicação de um herbicida auxínico. Os teores dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) produzidos pela rota do ácido chiquímico estão presentes na figura 10.

**Figura 8 – Teores de fenilalanina (A), tirosina (B) e triptofano (C) em plantas de soja com o gene dmo submetidas a aplicação de diferentes tratamentos em pós-emergência**



- Letras minúsculas iguais entre os tratamentos dentro de um mesmo período de avaliação, não diferem entre si pelo teste tukey ( $p \leq 0,05$ ). Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ( $p \leq 0,05$ ).

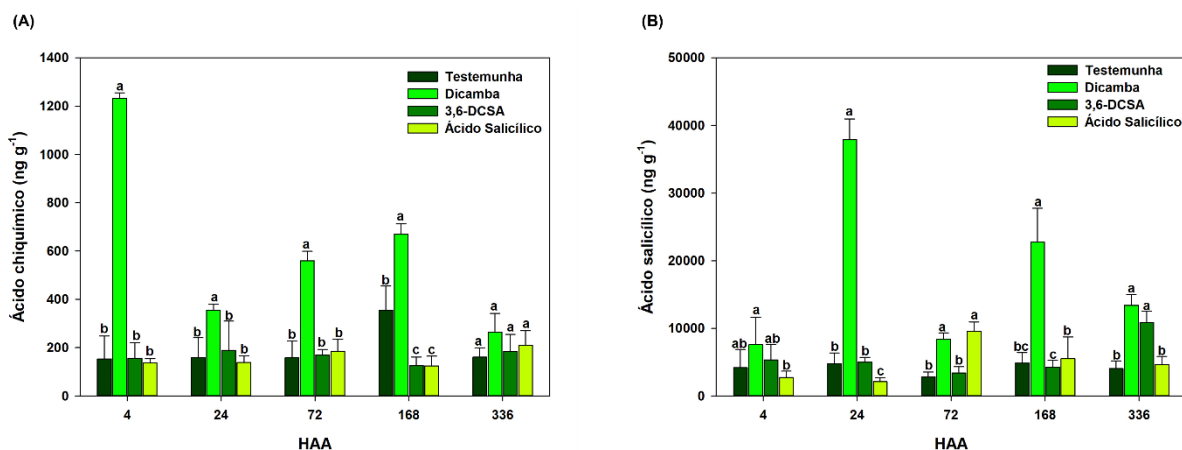
De maneira geral, destaca-se os maiores teores dos aminoácidos aromáticos quando houve a aplicação do herbicida auxínico. As concentrações de fenilalanina para os períodos de 4 e 24 HAA distinguiram apenas entre as aplicações de dicamba e de ácido salicílico. Para os demais períodos de avaliação, o uso do herbicida diferiu de todos os tratamentos. Este comportamento foi observado para tirosina e triptofano em todos os períodos de coleta, sendo que as diferenças nas concentrações de triptofano após 7 DAA foram observadas entre dicamba e todos os tratamentos, porém também entre 3,6-DCSA e ácido salicílico diferindo da testemunha.

A rota do ácido chiquímico é responsável pela síntese de compostos como o corismato, o qual é precursor na síntese de três aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano, os quais desempenham papel fundamental no metabolismo das plantas (TZIN; GALILI, 2010). Dentre estes compostos a fenilalanina está relacionada

a síntese de proteínas, além de atuar como substrato em outras vias na produção de compostos secundários, como ligninas, antocianinas e compostos fenólicos, enquanto a tirosina está relacionada a síntese de alcalóides e quinonas. O aminoácido triptofano atua como precursor na síntese de ácido indolacético, sendo este um hormônio de crescimento e expansão celular (VELINI et al., 2012).

O dicamba é um herbicida mimetizador de auxina, ou seja, atua de forma análoga as auxinas na planta, podendo em doses letais, causar um desbalanço hormonal e crescimento desordenado das plantas. Em doses menores, os herbicidas auxínicos podem desencadear a maior síntese de RNA, DNA e proteínas (OLIVEIRA JR et al., 2021). Pouco se sabe sobre o possível efeito de herbicidas auxínicos na rota do ácido chiquímico. A rota é muito explorada em estudos envolvendo o herbicida glyphosate, o qual atua na inibição da enzima EPSPs (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase) presente nesta rota. Alguns fitohormônios são sintetizados pela rota do ácido chiquímico e os esqueletos de carbono dos intermediários, como o corismato, são utilizados para a síntese de compostos como a auxina, ácido-indol acético (AIA), além de ácidos benzóicos e quinonas (ALMEIDA et al., 2023; MARCHIOSI et al., 2020; WIDHALM; DUDAREVA, 2015). Os teores de ácido chiquímico e ácido salicílico das plantas de soja com o gene *dmo* foram avaliados em todos os momentos de coleta e estão presentes na figura 11.

**Figura 9 – Teores de ácido chiquímico (A) e ácido salicílico (B) em plantas de soja com o gene dmo submetidas a aplicação de diferentes tratamentos em pós-emergência**

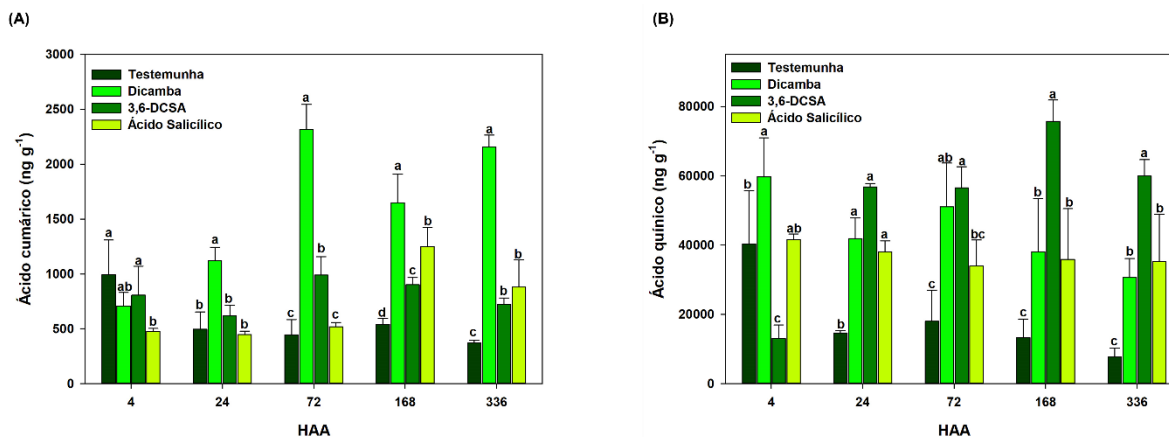


- Letras minúsculas iguais entre os tratamentos dentro de um mesmo período de avaliação, não diferem entre si pelo teste tukey ( $p \leq 0,05$ ). Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ( $p \leq 0,05$ ).

As primeiras avaliações das amostras de soja demonstraram maiores acúmulos de ácido chiquímico para as aplicações de dicamba aos 4, 24 HAA e 3, 7 DAA (Figura 11A). Aos 14 DAA as diferenças no acúmulo deste composto não foram significativas entre os tratamentos. O acúmulo de ácido chiquímico é um forte indicador de ação do herbicida glyphosate, o qual atua inibindo a enzima EPSPs (MONACO; WELLER; ASHTON, 2002). Porém, não há indícios na literatura de que herbicidas auxínicos possam interferir diretamente na rota do ácido chiquímico.

Com relação aos teores de ácido salicílico, observa-se novamente elevados teores deste composto para as plantas que foram tratadas com dicamba (Figura 11B). O tratamento herbicida após 4 horas da aplicação, diferiu nos teores de ácido salicílico quando comparado com a aplicação exógena de ácido salicílico. Para a avaliação de 24h, esta diferença foi ainda maior, diferindo também da testemunha e da aplicação de 3,6-diclorosalicílico. Ao avaliar-se 3 DAA, não houve diferenças entre dicamba e ácido salicílico, no entanto estes dois tratamentos diferiram da testemunha e do diclorosalicilato. O comportamento da aplicação de dicamba manteve-se aos 7 DAA e para a avaliação de 14 DAA observou-se comportamento semelhante entre dicamba e seu metabólito 3,6-DCSA, diferindo ambos do tratamento controle e da aplicação de ácido salicílico. As concentrações de ácido cumárico e ácido quínico, presentes na rota do ácido chiquímico estão na figura 12.

**Figura 10 – Teores de ácido cumárico (A) e ácido quínico (B) em plantas de soja com o gene dmo submetidas a aplicação de diferentes tratamentos em pós-emergência**



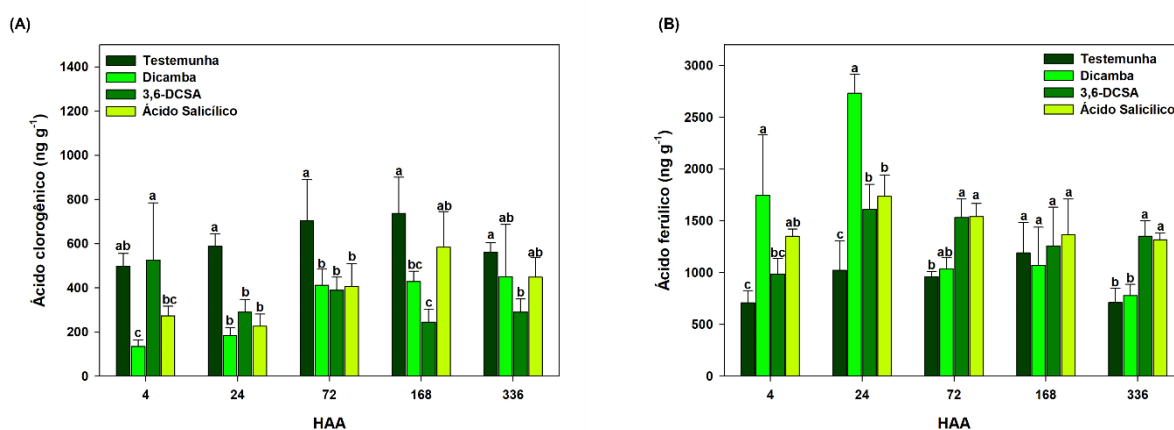
- Letras minúsculas iguais entre os tratamentos dentro de um mesmo período de avaliação, não diferem entre si pelo teste tukey ( $p \leq 0,05$ ). Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ( $p \leq 0,05$ ).

Os maiores teores de ácido cumárico (Figura 12A) foram novamente observados para as plantas que receberam a aplicação de dicamba, com exceção da avaliação de 4 HAA. O comportamento dos demais tratamentos foi variável de acordo com o período de coleta das plantas, porém no geral os tratamentos diferiram da testemunha. Para a avaliação de 3 DAA, diferenças significativas foram constatadas entre dicamba e 3,6-DCSA e destes com relação a testemunha e ácido salicílico. O comportamento desta variável foi semelhante para 7 e 14 DAA, uma vez que dicamba diferiu de todos os demais tratamentos, 3,6-DCSA e ácido salicílico diferindo entre si e com relação a testemunha.

As análises de ácido quínico (Figura 12B), revelaram após 4 horas da aplicação dos tratamentos que a aplicação de dicamba, novamente, diferiu da testemunha e da aplicação isolado de 3,6-DCSA. Porém, para as demais avaliações, verificou-se incrementos significativos nos teores de ácido quínico para a aplicação de 3,6-DCSA. Para a avaliação de 24 HAA, todos os tratamentos diferiram da testemunha, porém não diferiram entre si. Avaliando as plantas aos 3 DAA, novamente o tratamento com diclorosalicílico demonstrou-se superior à testemunha e ao ácido salicílico, porém semelhante com dicamba. As avaliações de 7 e 14 DAA demonstraram comportamentos semelhantes, destacando-se a superioridade dos tratamentos com 3,6-DCSA, o qual diferiu dos demais nas duas épocas finais de avaliação, enquanto

dicamba e ácido salicílico não diferiram entre si, mas foram superiores a testemunha. Os teores de ácido clorogênico e ácido ferúlico podem ser observados na figura 13.

**Figura 11 – Teores de ácido clorogênico (A) e ácido ferúlico (B) em plantas de soja com o gene dmo submetidas a aplicação de diferentes tratamentos em pós-emergência**



- Letras minúsculas iguais entre os tratamentos dentro de um mesmo período de avaliação, não diferem entre si pelo teste tukey ( $p \leq 0,05$ ). Barras correspondentes ao intervalo de confiança das médias ( $p \leq 0,05$ ).

Diferente das demais variáveis analisadas, os teores de ácido clorogênico parece ter sido menos influenciado pela aplicação de dicamba (Figura 13A). Na avaliação de 4HAA, 3,6-DCSA apresentou comportamento semelhante a testemunha, diferindo da aplicação de dicamba e de ácido salicílico. Porém, para 24 HAA e 3 DAA todos os tratamentos foram inferiores a testemunha. O comportamento da variável após 7 dias da aplicação manteve-se com a testemunha apresentando os maiores teores de ácido clorogênico, enquanto dicamba e diclorosalicílico foram semelhantes entre si, porém inferiores a testemunha, sendo que esta não diferiu da aplicação de ácido salicílico. Na avaliação final, 14 DAA, manteve-se a tendência de a testemunha ser superior aos demais tratamentos, porém diferindo apenas de 3,6-DCSA.

Ao contrário dos teores de ácido clorogênico, as concentrações de ácido ferúlico foram incrementadas em algumas avaliações de acordo com o tratamento (Figura 13B). Para as primeiras avaliações, observou-se que a aplicação de dicamba foi superior aos demais tratamentos, tanto para 4 HAA quanto para 24 HAA, sendo que com 24 HAA todos os tratamentos foram superiores à testemunha. Porém, aos 3 DAA apenas 3,6-DCSA e ácido salicílico diferiram da testemunha, enquanto aos 7 DAA todos os tratamentos foram semelhantes entre si. Aos 14 DAA, nota-se que diclorosalicílico e ácido salicílico foram superiores ao dicamba e a testemunha.

As maiores concentrações de ácido chiquímico nas plantas é uma característica de herbicidas inibidores da enzima EPSPs, como o glyphosate. Este efeito é observado em plantas sensíveis como cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (CARBONARI et al., 2014; NASCENTES et al., 2018), eucalipto (*Eucalyptus globulus*) (NASCENTES et al., 2018), trigo (*Triticum aestivum*) (ANDERSON; COBB; LOPER, 2001), soja (*Glycine max*) (SILVA et al., 2016; VELINI et al., 2008) e milho (*Zea mays*) (VELINI et al., 2008). Incrementos significativos nos teores de ácido quínico foram constatados para o tratamento com 3,6-DCSA em diferentes períodos, principalmente para 7 e 14 DAA. O incremento nos teores de ácido quínico está relacionado ao fato de que este composto possa servir como fonte de carbono para a síntese de compostos aromáticos (ZABALZA et al., 2017).

O ácido salicílico é um composto produzido pela rota do ácido chiquímico e está relacionado a proteção das plantas contra estresses bióticos e abióticos (KUMAR, 2015). Aos 14 DAA maiores concentrações de ácido salicílico foram observadas para dicamba e diclorosalicílico, assim como em outras avaliações para a aplicação de dicamba. No entanto, as plantas podem apresentar rotas alternativas para a síntese de ácido salicílico, dependentes das condições metabólicas em que a planta se encontra (MESCHÉDE et al., 2012). O ácido salicílico é capaz de mitigar injúrias provenientes de estresses abióticos sofridos pelas plantas, como toxidez por metais pesados FARAZ et al., 2020; ZANGANEH; JAMEI; RAHMANI, 2019), estresse por baixas temperaturas (IGNATENKO et al., 2019) e toxidez por herbicidas (KAYA; YIGIT, 2014; LIANG; LU; YANG, 2012; YIGIT et al., 2016). As injúrias sofridas por plantas de trigo provenientes da aplicação de herbicidas inibidores do fotossistema II, como o isoproturon, foram mitigadas a partir da aplicação exógena de ácido salicílico, uma vez que este composto melhorou a atividade do sistema antioxidante das plantas, potencializando a degradação do herbicida (LIANG; LU; YANG, 2012; LU et al., 2015). A degradação de dicamba em um composto salicilato como o 3,6-DCSA ou a aplicação exógena de diclorosalicílico parece ter relação com a rota de síntese do ácido salicílico, porém mais estudos são necessários para elucidar, de fato, a dinâmica destes compostos nas plantas, como por exemplo, estudos destes compostos em plantas submetidas a algum estresse, biótico ou abiótico.

Há algumas evidências de que o ácido clorogênico possa atuar na proteção das plantas ao ataque de fungos (MAHER et al., 1994), podendo em alguns casos atuar como protetor UV, uma vez que compostos fenólicos desempenham funções

como filtros de luz (GITZ, 2004). Este composto não respondeu da mesma maneira que as demais variáveis, uma vez que as plantas testemunhas apresentaram as maiores concentrações.

Incrementos na síntese de aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina, tirosina e triptofano são observados em alguns estudos de hormesis de glyphosate em diferentes plantas (FERNÁNDEZ-ESCALADA et al., 2016; GOMES; VELINI; CARBONARI, 2015; MAROLI et al., 2015; SILVA et al., 2018; ZULET et al., 2013). As maiores concentrações dos aminoácidos aromáticos podem estar relacionadas a degradação de proteínas e consequentemente a liberação dos aminoácidos que compoñham estas estruturas e não necessariamente a estímulos provenientes da aplicação dos tratamentos (GRAVENA et al., 2009; ORCARAY et al., 2010; PETERSEN et al., 2007; WANG, 2001). As maiores concentrações de fenilalanina nas aplicações de dicamba, principalmente aos 3, 7 e 14 DAA, corroboram principalmente com os dados de ácido cumárico e, em algumas avaliações, com os dados de ácido salicílico, uma vez que estes compostos têm como precursor o aminoácido, fenilalanina.

Assim como o ácido salicílico, o ácido jasmônico é um composto endógeno regulador, o qual está envolvido em alguns processos das plantas como germinação das sementes, além de atuar como resposta de defesa contra o ataque de patógenos e estresse a seca (FEUSSNER; WASTERACK, 2002). Há poucos relatos na literatura com relação ao efeito de auxinas sintéticas na síntese destes compostos sinalizadores, como o ácido salicílico e ácido jasmônico. No entanto, alguns autores compararam os efeitos de herbicidas auxínicos nas concentrações internas de ácido jasmônico em plantas de *Galium aparine*, tratando-as com 10 µl dos tratamentos a base de dicamba e Quinclorac durante 24h em sistema hidropônico e verificaram incrementos nos teores internos de ácido jasmônico em relação ao tratamento controle no tecido das raízes das plantas (GROSSMANN; ROSENTHAL; KWIATKOWSKI, 2004).

Houve estímulos provenientes da aplicação de dicamba em diferentes variáveis da rota do ácido chiquímico. O incremento nos teores dos aminoácidos, fenilalanina, tirosina e triptofano, são justificáveis, uma vez que percebe-se incrementos de outros compostos dentro da rota. Os maiores incrementos parecem ser no início da rota, principalmente devido ao incremento nos teores de ácido chiquímico e ácido quínico.

O ácido quínico é sintetizado na região dos plastídios a partir de intermediários presentes na rota do ácido chiquímico, podendo ser produzido a partir da desidratação do chiquimato, justificando a relação de incremento tanto de ácido chiquímico quanto de ácido quínico. O ácido clorogênico pode ter como precursor da sua síntese o ácido quínico, no entanto, não foi constatado incrementos significativos para ácido clorogênico, possivelmente devido ao fato de que a síntese deste composto é dependente de intermediários sintetizados e envolvidos em outras rotas, como por exemplo a rota de síntese de fenilpropanóides. Além disso, constatou-se incrementos nas concentrações de ácido cumárico, relacionado principalmente às maiores concentrações do aminoácido fenilalanina, porém também pode estar relacionado ao estímulo de ácido quínico, uma vez que ácido quínico e chiquimato podem ser esterificados e convertidos em ácido cumárico na rota dos fenilpropanóides (MARCHIOSI et al., 2020).

Diante do exposto, verifica-se que há relação do herbicida dicamba e dos compostos salicilatos, tais como o 3,6-DCSA e o ácido salicílico, com alguns produtos da rota do ácido chiquímico, como o ácido quínico e ácido salicílico. Há relatos da influência de herbicidas auxínicos no estímulo a síntese de outros compostos, tal como o ácido jasmônico. No entanto, maiores estudos são necessários a fim de elucidar, de fato, a real influência de herbicidas auxínicos na rota do ácido chiquímico, bem como o comportamento de compostos salicilatos, via aplicação exógena ou via degradação do herbicida dicamba, em condições de imposição de estresse em plantas de soja com o gene *dmo*. Outro ponto a ser compreendido é se há o estímulo de sub-doses de herbicidas auxínicos, neste caso o dicamba, na rota do ácido chiquímico em plantas suscetíveis, uma vez que uma das possibilidades dos incrementos observados neste estudo, esteja relacionado a degradação de parte do produto pela biotecnologia e o incremento tenha sido estimulado por sub-doses do produto após uma degradação parcial, desencadeando efeitos similares a hormesis.

## 5 CONCLUSÕES

As plantas de soja com o gene *dmo* podem apresentar pequenas reduções na assimilação líquida de CO<sub>2</sub> em condições de aplicação do herbicida dicamba em pós emergência na dose de 720 g.e.a ha<sup>-1</sup>.

As reduções na taxa fotossintética observadas para a aplicação de dicamba não comprometem o desempenho da eficiência de carboxilação.

A biotecnologia de soja com o gene *dmo* mostra-se eficiente na degradação do dicamba a partir da conversão do herbicida em 3,6-diclorosalicílico, sendo encontrado grandes concentrações do metabólito após 7 dias da aplicação do herbicida.

Aos 3 DAA de dicamba, a concentração de 3,6-diclorosalicílico é superior a concentração de dicamba.

Após 24h da aplicação de dicamba, as concentrações internas do herbicida nas plantas de soja foram inferiores a 0,05 g ha<sup>-1</sup>.

O herbicida dicamba estimulou a síntese de aminoácidos aromáticos, bem como desencadeou estímulos na rota do ácido chiquímico.

Compostos salicilatos como o produto da degradação do dicamba pela biotecnologia, pode apresentar influência na produção de alguns compostos da rota do ácido chiquímico, tais como ácido salicílico e ácido quínico.

É necessário maiores estudos para o aprimoramento do entendimento sobre possíveis efeitos de herbicidas auxínicos sobre compostos produzidos via rota do ácido chiquímico, tais como o estímulo de sub-doses e a dinâmica destes compostos em condições de estresses bióticos ou abióticos.



## REFERÊNCIAS

- ADEGAS, F. S. Impacto econômico da resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil. **Circular Técnica**, v. 132, p. 12, 2017.
- ALBRECHT, A. J. P. et al. **INTERFERÊNCIA DE DENSIDADES POPULACIONAIS DE BUVA NA PRODUTIVIDADE DE SOJA**. Anais: Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas. **Anais...**2018.
- ALBRECHT, L. P. et al. Métodos de controle de plantas daninhas. Em: BARROSO, A. A. M.; MURATA, A. T. (Eds.). **Matologia: estudos sobre plantas daninhas**. 1. ed. Jaboticabal: Fábrica da Palavra, 2021a. p. 145–169.
- ALBRECHT, L. P. et al. Manejo de organismos geneticamente modificados tolerantes a herbicidas. Em: BARROSO, A. A. M.; MURATA, A. T. (Eds.). **Matologia: um estudo sobre plantas daninhas**. 1. ed. Jaboticabal: Fábrica da Palavra, 2021b. p. 506–547.
- ALMEIDA, A. M. et al. Revisiting the shikimate pathway and highlighting their enzyme inhibitors. **Phytochemistry Reviews**, 19 set. 2023.
- ANDERSON, K. A.; COBB, W. T.; LOPER, B. R. Analytical method for determination of shikimic acid: shikimic acid proportional to glyphosate application rates. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 32, n. 17–18, p. 2831–2840, 31 out. 2001.
- APROSOJA. **Utilização da soja no Brasil**. Associação brasileira dos produtores de soja, 2018. Disponível em: <<http://www.aprosoja.com.br/>>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- BARROSO, A. A. M.; MURATA, A. T. **Matologia**. 1. ed. Jaboticabal: Fábrica da Palavra, 2021.
- BAYER CROPSOURCE. **XtendiMax Herbicide with VaporGrip Technology**. Roundup Ready Xtend Technology, 2021. Disponível em: <<https://www.roundupreadyxtend.com/products/Pages/xtendimax.aspx>>. Acesso em: 8 jul. 2023.
- BEHRENS, M. R. et al. Dicamba resistance: Enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies. **Science**, v. 316, n. 5828, p. 1185–1188, 2007.

BEHRENS, R.; LUESCHEN, W. E. Dicamba volatility. **Weed Science**, v. 27, n. 5, p. 486–493, 12 set. 1979.

BHATTI, M.; FENG, P. C. C.; PITKIN, J. **Methods and Compositions For Improving Plant Health.**, 2014.

BORÉM, A. et al. **Soja: do plantio à colheita**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo, SP: Oficina de Textos, 2022.

BYKER, H. P. et al. Control of glyphosate-resistant Horseweed (*Conyza canadensis*) with dicamba applied preplant and postemergence in dicamba-resistant soybean. **Weed Technology**, v. 27, n. 3, p. 492–496, set. 2013.

CARBONARI, C. A. et al. Glyphosate effects on sugarcane metabolism and growth. **American Journal of Plant Sciences**, v. 05, n. 24, p. 3585–3593, 2014.

CARBONARI, C. A. et al. Volatilization of standalone dicamba and dicamba plus glyphosate as function of volatility reducer and different surfaces. **Agriculture (Switzerland)**, v. 10, n. 11, p. 1–10, 2020.

CIB. **Biotecnologia**. Centro de informação de biotecnologia, 2018. Disponível em: <<https://croplifebrasil.org/>>. Acesso em: 19 fev. 2023.

CONAB, C. N. DE A. Acompanhamento da safra brasileira de Grãos: Safra 2022/23. **Boletim da safra 2022/23**, v. 10, n. 9, p. 117, 2023.

CORK, D. J.; KRUEGER, J. P. Microbial transformations of herbicides and pesticides. **Advances in Applied Microbiology**, p. 1–66, 1991.

COSTA, R. N. **Hormesis de glyphosate em café: respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas**. Tese de Doutorado—Botucatu, SP: Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2020.

CTNBIO. **Liberação comercial de plantas de soja**. Comissão técnica nacional de biossegurança, 2023. Disponível em: <<http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial/#/liberacao-comercial/consultar-processo>>. Acesso em: 19 jul. 2023.

DARAMOLA, O. S. et al. Influence of row spacing and weed control methods on weed population dynamics in soybean (*Glycine max* L.). **International Journal of Pest Management**, v. 68, n. 1, p. 43–58, 2 jan. 2022.

DELANEY, T. P. et al. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. **Science**, v. 266, n. 5188, p. 1247–1250, 18 nov. 1994.

DURNER, J.; SHAH, J.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid and disease resistance in plants. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 7, p. 266–274, 1997.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 42, p. 185–209, 2004.

FAIZE, L.; FAIZE, M. Functional analogues of salicylic acid and their use in crop protection. **Agronomy**, v. 8, n. 1, 2018.

FARAZ, A. et al. Supplementation of salicylic acid and citric acid for alleviation of cadmium toxicity to *Brassica juncea*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 39, n. 2, p. 641–655, 24 jun. 2020.

FERNÁNDEZ-ESCALADA, M. et al. Characterization of the *Amaranthus palmeri* physiological response to glyphosate in susceptible and resistant populations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 95–106, 13 jan. 2016.

FEUSSNER, I.; WASTERACK, C. The lipoxygenase pathway. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, n. 1, p. 275–297, jun. 2002.

GAZZIERO, D. L. P. et al. Manejo integrado de plantas daninhas. Em: VELINI, E. D. et al. (Eds.). **Glyphosate uso sustentável**. Botucatu: FEPAF, 2012. p. 185–202.

GAZZIERO, D. L. P. et al. **Efeitos da convivência do capim-amargoso na produtividade da soja**. Anais: Congresso brasileiro da ciência das plantas daninhas. **Anais**: 2013.

GITZ, D. C. Effects of a PAL inhibitor on phenolic accumulation and UV-B tolerance in *Spirodela intermedia* (Koch.). **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 398, p. 919–927, 12 mar. 2004.

GOMES, G. L. G. C.; VELINI, E. D.; CARBONARI, C. A. Fosfito de potássio não protege plantas de milho contra os efeitos fitotóxicos do glyphosate. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 3, p. 291–296, set. 2015.

GRAVENA, R. et al. Low glyphosate rates do not affect *Citrus limonia* (L.) Osbeck seedlings. **Pest Management Science**, v. 65, n. 4, p. 420–425, abr. 2009.

GRESSEL, J.; SEGEL, L. A.; LEBARON, H. M. Interrelating factors controlling the rate of appearance of resistance: the outlook for the future. Em: **Herbicide Resistance in Plants**. Nova York: J. Wiley, 1982. p. 325–347.

GROSSMANN, K.; ROSENTHAL, C.; KWIATKOWSKI, J. Increases in jasmonic acid caused by indole-3-acetic acid and auxin herbicides in cleavers (*Galium aparine*). **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 7, p. 809–814, jul. 2004.

HARTZLER, B. **Dicamba: Past, present, and future**. Integrated Crop Management Conference - Iowa State University. **Anais...**2017.

HEAP, I. **The international survey of herbicide resistant weeds**. International herbicide-resistant weed database, 2023. Disponível em: <<http://www.weedscience.org>>. Acesso em: 17 ago. 2023.

HERMAN, P. L. et al. A three-component Dicamba O-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Gene isolation, characterization, and heterologous expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 26, p. 24759–24767, 1 jul. 2005.

HRAC-BR. **Mecanismos de Ação dos Herbicidas**. Comitê de ação a resistência aos herbicidas, 2023. Disponível em: <[www.hrac-br.org](http://www.hrac-br.org)>. Acesso em: 17 ago. 2023.

HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. **Economic Botany**, v. 24, n. 4, p. 408–421, out. 1970.

IGNATENKO, A. et al. Exogenous salicylic acid treatment induces cold tolerance in wheat through promotion of antioxidant enzyme activity and proline accumulation. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 41, n. 6, p. 80, 24 jun. 2019.

ISAAA, I. S. FOR THE A. OF A. A. **GM Approval Database**. International service for the Acquisition of agri-biotech applications, 2023. Disponível em: <<https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>>. Acesso em: 8 jul. 2023.

JASIENIUK, M.; MAXWELL, B. D. Populations genetics and the evolution of herbicide resistance in weeds. **Phytoprotection**, v. 75, n. 4, p. 25–35, 17 jul. 1994.

KAYA, A.; YIGIT, E. The physiological and biochemical effects of salicylic acid on sunflowers (*Helianthus annuus*) exposed to flurochloridone. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 106, p. 232–238, ago. 2014.

KHAN, W.; PRITHIVIRAJ, B.; SMITH, D. L. Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. **J. Plant Physiol**, v. 160, p. 485–492, 2003.

KIRBY, C. **The hormone weedkillers: a short history of their discovery and development**. Londres: British Crop Protection Council, 1980.

KRUEGER, J. P. et al. Isolation and identification of microorganisms for the degradation of dicamba. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 534–538, 1989.

KUMAR, D. Biotic and abiotic stress signaling mediated by salicylic acid. Em: PANDEY, G. K. (Ed.). **Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants**. New York: Springer, 2015. p. 329–346.

LI, N. et al. 3,6-Dichlorosalicylate catabolism is initiated by the Dsmabc cytochrome p450 monooxygenase system in *Rhizorhabdus dicambivorans* Ndbn-20. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 2133–2150, 2018.

LI, Q. et al. Cinnamic acid pretreatment mitigates chilling stress of cucumber leaves through altering antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 9, p. 927–934, jun. 2011.

LI, Y. F. et al. Exogenous salicylic acid alleviates halosulfuron-methyl toxicity by coordinating the antioxidant system and improving photosynthesis in soybean (*Glycine max* Merr.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 42, n. 5, p. 1–10, 2020.

LIANG, L.; LU, Y. L.; YANG, H. Toxicology of isoproturon to the food crop wheat as affected by salicylic acid. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 6, p. 2044–2054, 10 jul. 2012.

LU, Y. C. et al. Enhanced degradation of herbicide isoproturon in wheat rhizosphere by salicylic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 92–103, 14 jan. 2015.

MAHER, E. A. et al. Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 16, p. 7802–7806, 2 ago. 1994.

MARCHIOSI, R. et al. Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, n. 4, p. 865–906, 7 ago. 2020.

MAROLI, A. S. et al. Metabolic profiling and enzyme analyses indicate a potential role of antioxidant systems in complementing glyphosate resistance in an *Amaranthus palmeri* biotype. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 41, p. 9199–9209, 21 out. 2015.

MESCHEDE, D. K. et al. Alterações no metabolismo da cana-de-açúcar em função da aplicação de maturadores. **Planta Daninha**, v. 30, n. 1, p. 113–119, mar. 2012.

MITHILA, J. et al. Evolution of resistance to auxinic herbicides: Historical perspectives, mechanisms of resistance, and implications for broadleaf weed management in agronomic crops. **Weed Science**, v. 59, n. 4, p. 445–457, dez. 2011.

MONACO, T. J.; WELLER, S. C.; ASHTON, F. M. **Weed science: Principles and practices**. 4. ed. Nova York: John Willey & Sons, 2002.

MONQUERO, P. A. **Manejo de plantas daninhas na cultura da soja: uma filosofia de trabalho**. São Carlos: RiMa, 2014.

NASCENTES, R. F. et al. Low doses of glyphosate enhance growth, CO<sub>2</sub> assimilation, stomatal conductance and transpiration in sugarcane and eucalyptus. **Pest Management Science**, v. 74, n. 5, p. 1197–1205, 4 maio 2018.

OLIVEIRA JR, R. S. et al. Mecanismo de ação de herbicidas. Em: BARROSO, A. A. M.; MURATA, A. T. (Eds.). **Matologia: um estudo sobre plantas daninhas**. 1. ed. Jaboticabal: Fábrica da Palavra, p. 170-204. 2021.

ORCARAY, L. et al. The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. **Pest Management Science**, v. 66, n. 3, p. 262–269, mar. 2010.

PARASHAR, A. et al. Salicylic acid enhances antioxidant system in Brassica juncea grown under different levels of manganese. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 551–558, set. 2014.

PETERSEN, I. L. et al. Metabolic effects in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings after root exposure to glyphosate. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 89, n. 3, p. 220–229, nov. 2007.

PITELLI, R. A.; DURIGAN, J. C. **Terminologia para períodos de controle e de convivência das plantas daninhas em culturas anuais e bianuais**. Congresso Brasileiro de Herbicidas e Plantas Daninhas. **Anais...**1984.

RADOSEVICH, S. R.; HOLT, J. S.; GHERSA, C. M. **Ecology of weeds and invasive plants: relationship to agriculture and natural resource management**. 3. ed. Nova York: John Wiley & Sons, 2007.

RIZZARDI, M. A.; ROCKENBACH, A. P.; SCHNEIDER, T. Residual herbicides increase the period prior to interference in soybean cultivars. **Planta Daninha**, v. 38, 2020.

RÜDELL, E. C. et al. Weed interference capacity on soybean yield. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 74, n. 2, p. 9541–9547, 2021.

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C.; BARROS, H. B. Origem, evolução e importância econômica. Em: SEDIYAMA, T. (Ed.). **Tecnologias de produção e usos da soja**. v.1, Londrina, PR: p. 1–5, 2009.

SHULAEV, V.; SILVERMAN, P.; RASKIN, I. Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. **Nature**, v. 385, n. 6618, p. 718–721, 20 fev. 1997.

SILVA, A. A. P. et al. Períodos de interferência entre plantas daninhas e a cultura da soja rr<sup>®</sup> na região centro ocidental paranaense. **Planta Daninha**, v. 33, n. 4, p. 707–716, 1 out. 2015.

SILVA, D. R. O. et al. Photosynthetic performance of glyphosate resistant and glyphosate susceptible hairy fleabane under light intensity. **Planta Daninha**, v. 35, p. 1–8, 8 jan. 2018.

SILVA, F. M. L. et al. Low doses of glyphosate change the responses of soyabean to subsequent glyphosate treatments. **Weed Research**, v. 56, n. 2, p. 124–136, abr. 2016.

SMITH, A. E. Breakdown of the herbicide dicamba and its degradation product 3,6-dichlorosalicylic acid in prairie soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 601–605, 1974.

SOUZA, L. S.; VELINI, E. D.; MAIOMONI-RODELLA, R. C. S. Efeito alelopático de plantas daninhas e concentrações de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) no desenvolvimento inicial de eucalipto (*Eucalyptus grandis*). **Planta Daninha**, v. 21, n. 3, p. 343–354, dez. 2003.

STERLING, T. M.; HALL, J. C. Mechanism of action of natural auxins and the auxinic herbicides. Em: ROE, R. M.; BURTON, J. D.; KUHR, R. J. (Eds.). **Herbicide activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology**. Amsterdam: IOS Press, 1997. p. 111–139.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TZIN, V.; GALILI, G. New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. **Molecular Plant**, v. 3, n. 6, p. 956–972, nov. 2010.

UNDERWOOD, M. G. et al. The addition of dicamba to post applications of quizalofop-p-ethyl or clethodim antagonizes volunteer glyphosate-resistant corn control in dicamba-resistant soybean. **Weed Technology**, v. 30, n. 3, p. 639–647, 20 set. 2016.

USDA, **USDA : World Markets and Trade**. U.S. department of Agriculture, 2023. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/>>. Acesso em: 25 jul. 2023.

VELINI, E. D. et al. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. **Pest Management Science**, v. 64, n. 4, p. 489–496, 21 abr. 2008.

VELINI, E. D. et al. Modo de ação do glyphosate. Em: VELINI, E. D. (Ed.). **Glyphosate: uso sustentável**. Botucatu: Fepaf, p. 1–213, 2012.

WANG, C. Y. Effect of glyphosate on aromatic amino acid metabolism in purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). **Weed Technology**, v. 15, p. 628–635, 2001.

WANG, X. et al. A three-component enzyme system catalyzes the o demethylation of the herbicide dicamba in *Pseudomonas maltophilia* DI-6. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1623–6, abr. 1997.

WIDHALM, J. R.; DUDAREVA, N. A familiar ring to it: Biosynthesis of plant benzoic acids. **Molecular Plant**, v. 8, n. 1, p. 83–97, jan. 2015.

YANG, J. et al. Analysis of dicamba degradation by *pseudomonas maltophilia* using high-performance capillary electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 219, n. 1, p. 37–42, maio 1994.

YIGIT, E. et al. Effect of salicylic acid and selenium on antioxidant system of *Avena sativa* L. under fenoxaprop-p-ethyl stress. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 25, n. 3, p. 874–884, 2016.

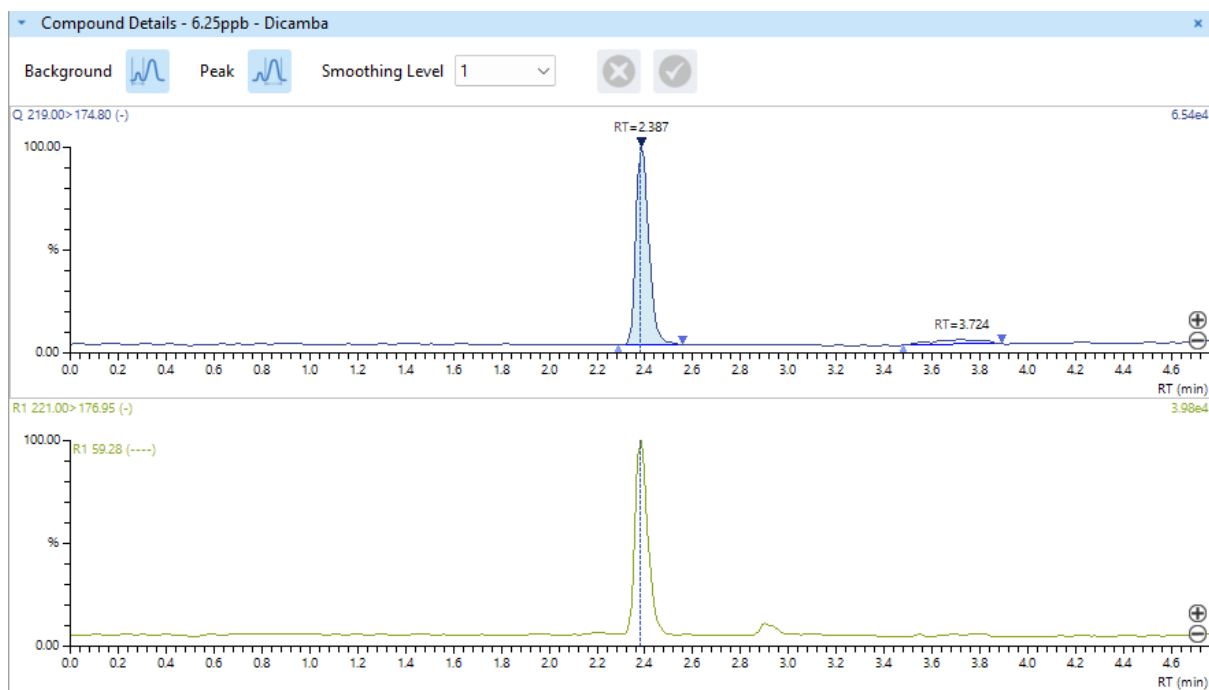
ZABALZA, A. et al. The pattern of shikimate pathway and phenylpropanoids after inhibition by glyphosate or quinate feeding in pea roots. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 141, p. 96–102, set. 2017.

ZANGANEH, R.; JAMEI, R.; RAHMANI, F. Role of salicylic acid and hydrogen sulfide in promoting lead stress tolerance and regulating free amino acid composition in *Zea mays* L. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 41, n. 6, p. 94, 14 jun. 2019.

ZULET, A. et al. Proteolytic Pathways induced by herbicides that inhibit amino acid biosynthesis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e73847, 6 set. 2013.



## APÊNDICE A – Cromatograma do herbicida dicamba gerado na concentração de 6.25 ppb



## APÊNDICE B – Cromatograma do 3,6-diclorosalicílico (3,6-DCSA) gerado na concentração de 100 ppb

