

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUTIVIDADE E RESPOSTAS ANTIOXIDANTES DA  
SOJA ENLIST E3™ SUBMETIDA À APLICAÇÃO DE  
HERBICIDAS**

**Thiago Souza Oliveira**  
Engenheiro Agrônomo

**2019**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUTIVIDADE E RESPOSTAS ANTIOXIDANTES DA  
SOJA ENLIST E3™ SUBMETIDA À APLICAÇÃO DE  
HERBICIDAS**

**Discente: Thiago Souza Oliveira**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Priscila Lupino Gratão**

**Coorientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal)

O48p

Oliveira, Thiago Souza

Produtividade e respostas antioxidantes da soja enlist E3TM submetida à aplicação de herbicidas / Thiago Souza Oliveira. -- Jaboticabal, 2019

67 f. : tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Priscila Lupino Gratão

Coorientador: Pedro Luís da Costa Aguiar Alves

1. Glycine max. 2. Herbicidas. 3. Enzimas. 4. Tolerância. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**THIAGO SOUZA OLIVEIRA** – Nascido em 01 de agosto de 1989, no município de Humaitá, estado do Amazonas, filho de Maria Rosário Gomes e Elis Nonato de Oliveira. Gradou-se em Engenharia Agrônoma pela Universidade Federal do Amazonas – Câmpus de Humaitá - AM, no dia 26 de janeiro de 2013. Durante a graduação, estagiou no Laboratório de Fitopatologia (UFAM-Câmpus de Humaitá - AM), e desenvolveu projetos científicos na área de controle alternativo de fungos. Em 2013, ingressou no curso de Mestrado em Produção Vegetal pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, desenvolvendo trabalhos com matocompetição, com auxílio financeiro da Fapeam (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas) de agosto/2013 a julho/2015. Em agosto/2015, ingressou no curso de Doutorado em Produção Vegetal pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, desenvolvendo trabalhos com fisiologia de plantas e controle químico, com auxílio financeiro da Fapeam (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas) de agosto/2015 a junho/2019, que possibilitou a realização desta tese.

*À minha família - minha base, minha fortaleza, meu exemplo de amor e dedicação.*

## **DEDICO**

*A todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão desta etapa da minha vida.*

## **OFEREÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me proporcionado vida e saúde para que eu pudesse concretizar este sonho, e por ter me guiado em todos os momentos da vida.

A minha família, em especial aos meus pais Maria e Elis, às minhas irmãs Lidiane e Liliane, por serem o meu porto seguro. Amo vocês!

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscila Lupino Gratão, pelas orientações, disponibilidade, dedicação, amizade, paciência, e principalmente pelos conselhos. Prof<sup>a</sup>. Priscila, muito obrigado por confiar em mim! Sem o seu apoio, nada disso seria possível.

Ao meu coorientador Prof<sup>o</sup>. Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves, por todo o apoio oferecido no decorrer do doutorado e pelo auxílio oferecido para a confecção desta tese. Meu muito obrigado!

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Jaboticabal e ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de cumprir mais esta etapa da minha vida. Agradeço a todos os professores da Pós-graduação, por terem contribuído, de forma tão valiosa, para a minha formação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM, pela concessão do auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho. A concessão da bolsa de Doutorado, sem dúvida, possibilitou que todos os objetivos propostos fossem cumpridos da melhor forma possível.

A todos os colegas do Laboratório de Plantas Daninhas e Laboratório de Fisiologia Vegetal pelo apoio, disponibilidade, ajuda, colaboração e pelos ótimos momentos de convivência, que jamais serão esquecidos.

## SUMÁRIO

|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....   | 1                                    |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 1                                    |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....   | 2                                    |
| 2.1. Características morfológicas da soja .....  | 2                                    |
| 2.2. Importância da cultura da soja .....  | 4                                    |
| 2.3. Soja Enlist E3™ .....   | 6                                    |
| 2.4. Mecanismo de ação dos herbicidas .....  | 7                                    |
| 2.4.1. Glufosinato de amônio.....  | 7                                    |
| 2.4.2. Glyphosate .....  | 8                                    |
| 2.4.3. 2,4-Diclorofenilacético .....   | 10                                   |
| 2.5. Estresse oxidativo e sistemas de defesa antioxidante .....  | 11                                   |
| 3. REFERÊNCIAS.....  | 14                                   |
| CAPÍTULO 2 – SELETIVIDADE E PRODUTIVIDADE DA SOJA ENLIST E3™<br>A APLICAÇÃO DE HERBICIDAS.....                     | 22                                   |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 24                                   |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....  | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 4. CONCLUSÃO.....  | 25                                   |
| 5. REFERÊNCIAS.....  | 26                                   |
| CAPÍTULO 3 - RESISTÊNCIA A HERBICIDAS NA SOJA ENLIST E3™: UMA<br>ABORDAGEM ENVOLVENDO RESPOSTAS ANTIOXIDANTES..... | 29                                   |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 30                                   |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....  | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 2.1. Análises de crescimento.....  | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 2.2. Análises bioquímicas.....   | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 2.2.1. Peroxidação lipídica .....  | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| 2.2.2. Peróxido de Hidrogênio .....                           | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 2.2.3. Extração enzimática e determinação de proteínas        | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 2.2.4. Ensaio de superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)      | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 2.2.5. Ensaio de Catalase (CAT, EC 1.11.1.6) ....             | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 2.2.6. Ensaio de ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11)     | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 2.2.7. Ensaio da Glutathione-S-Transferase (GST, EC 2.5.1.18) | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 2.3. Análise estatística.....                                 | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 3. RESULTADOS e DISCUSSÃO .....                               | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 4. CONCLUSÃO .....  | 32                                   |
| 5. REFERÊNCIAS.....   | 32                                   |

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) é a cultura leguminosa mais cultivada no mundo, sendo a principal fonte de proteína vegetal para uso dentro de uma sociedade moderna. Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, com 32% do total produzido (USDA, 2019). Na safra de 2017/2018, a produção total brasileira foi estimada em cerca de 114,96 milhões de toneladas, com área de 34,7 milhões de hectares (CONAB, 2018). Isto pode estar relacionado à alguns fatores ambientais, como os estresses hídrico e térmico, assim como a seleção de cultivares e o manejo adotado pelos produtores para o controle de pragas e doenças.

De acordo com Song et al. (2017), um dos principais motivos dos baixos rendimentos da soja está relacionado aos problemas ocasionados pelo manejo inadequado das plantas daninhas. As plantas daninhas competem com a cultura da soja por luz, água e nutrientes, podendo reduzir de forma significativa a qualidade e o rendimento da cultura (Soltani et al., 2017), causando perdas que podem chegar a 92,5% (Benedetti et al., 2009; Nepomuceno et al., 2007; Saberli, Mohammadi, 2015; Silva et al., 2009; Soltani et al., 2017; Song et al., 2017).

Entre as alternativas de controle de plantas daninhas existentes, o controle químico apresenta destaque como o mais usual em todo o mundo, sendo o mais econômico e eficiente se comparado aos demais controles, principalmente quando aplicado em extensas áreas de cultivo com alta infestação de plantas daninhas (Alvino et al., 2011).

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), por meio do Programa “National Agricultural Statistics Service” (NASS), o uso de herbicidas no cultivo da soja alcançou 96% das áreas cultivadas em 2015. Dentre os herbicidas, o sal de glyphosate de potássio, sal de isopropylamine de glyphosate, sulfentrazone, fomesafen sodium e chlorimuron ethyl foram utilizados, respectivamente, em 55%, 30%, 17%, 16% e 12% das áreas cultivadas com soja (USDA, 2016).

Apesar do controle químico ser uma das melhores opções, muitos dos produtos utilizados ao controlar as plantas daninhas, podem afetar negativamente a cultura e, por isso, deixam de ser uma opção viável. Com o intuito de prevenir os danos na cultura e minimizar os impactos causados pela resistência de plantas daninhas, as multinacionais têm investido no desenvolvimento de cultivares transgênicas resistentes a herbicidas. Nas últimas décadas, os esforços na criação de novas cultivares de soja, levaram a maior habilidade das plantas em apresentar maiores rendimentos em comparação com cultivares mais antigas em ambientes altamente competitivos (Hammer et al., 2017).

A criação de plantas geneticamente modificadas aumentou substancialmente o rendimento da soja nos últimos 30 anos (Oerke, 2006; Rincker et al., 2014). Specht et al. (2014) estimaram que dois terços dos ganhos no rendimento da soja foram resultados de melhorias genéticas e que um terço foi resultado de melhorias agronômicas. Com o advento de novas tecnologias, os sistemas de produção estão mudando significativamente, especialmente para culturas como soja (*Glycine max*), milho (*Zea mays* L.) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (Soltani et al., 2017).

Dentre as cultivares atuais no mercado, destacam-se a soja RR (Roundup Ready®), resistente ao glyphosate e a soja LL (Liberty Link®), resistente ao glufosinato de amônio. A adoção da soja resistente ao glyphosate e ao glufosinato resultou em uma mudança nas práticas de aplicação de herbicidas pós-emergentes e mudou a composição das comunidades infestantes (Vencill et al., 2012). Com a inclusão dessas cultivares transgênicas resistentes à herbicidas, a soja tornou-se mais competitiva com as plantas daninhas, em parte devido ao aumento do vigor das plântulas, ao crescimento mais rápido e aumento da densidade de semeadura. No entanto, a ineficiência de controle de plantas daninhas na soja devido ao incremento da ocorrência de espécies resistentes ao glyphosate pode aumentar as perdas de rendimentos (Soltani et al., 2017).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Características morfológicas da soja**

A soja é pertencente ao reino *Plantae*, divisão *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, subfamília *Faboideae*, gênero *Glycine*, espécie *Glycine max* (Sediyama et al., 2009). É uma planta autógama e cleistógama, cuja taxa da polinização cruzada geralmente é inferior que 1% (Sediyama et al., 2016).

O sistema de desenvolvimento radicular da soja é constituído por uma raiz axial principal e por diversas raízes secundárias, nas quais são formados os nódulos que são resultantes da simbiose com as bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*, que fixam o nitrogênio do ar atmosférico presente no solo. O comprimento das raízes pode chegar até 1,80 m, sendo que a maior parte delas se encontra com cerca de 15 cm de profundidade (Sediyama et al., 2016).

A altura das plantas é uma razão da interação da região (condições ambientais) e da cultivar (genótipo). A soja pode apresentar três tipos de crescimento diretamente correlacionados com o porte da planta: indeterminado, semideterminado e determinado. A planta de soja é fortemente influenciada pelo comprimento do dia (fotoperíodo). Em regiões ou épocas de fotoperíodo mais curto, durante a fase vegetativa da planta ela tende a induzir o florescimento precoce e apresentar consecutiva queda de sua produtividade (Oliveira et al., 1997).

O caule da soja é herbáceo geralmente ereto e pouco ramificado, possui na sua extremidade uma inflorescência racemosa terminal em cultivares de crescimento determinado, por outro lado, as cultivares de crescimento indeterminado não possuem inflorescência terminal, apenas a axilar (Nepomuceno et al., 2008; Sediyama et al., 2016).

O ciclo de desenvolvimento da soja pode variar de 70 dias para as cultivares mais precoces a 200 dias para as cultivares mais tardias. Em geral, as cultivares brasileiras têm ciclo entre 100 a 160 dias, dependendo da região e da época de semeadura (Matsuo; Ferreira; Sediyama, 2016), sendo que, devido as condições climáticas, manejo de doenças e pragas, os produtores têm preferido os materiais com ciclos cada vez mais precoces.

Durante todo o ciclo, são distinguidos quatro tipos de folhas nas plantas: cotiledonares, folhas primárias ou simples, folhas trifolioladas ou compostas e

prófilos simples. Sua coloração, na maioria das cultivares, é verde pálida e, em outro, verde mais intenso (Gava, 2014).

Anteriormente as cultivares classificavam-se por ciclo (precoce, semiprecoce, médio ou tardio), mas esse critério é muito geral, pois uma variedade precoce pode apresentar duração de ciclo diferente de acordo com a região em que está inserida. Comparando-se variedades precoces em diferentes locais do Paraná, por exemplo, a duração do ciclo pode ser de 117 a 123 dias no oeste, menor do que 115 dias no norte e maior do que 125 dias no centro-sul do Estado. Dessa forma, o ciclo da mesma cultivar pode ter uma variação de 10 a 12 dias de uma região para outra (Aliprandini et al., 2009).

No verão, os dias são mais longos no Sul do Brasil (alta latitude) do que próximo ao Equador (menor latitude), havendo assim maior fotoperíodo e para a cultura da soja, quanto menos luz, mais rapidamente ela entrará em estágio reprodutivo (florescimento). Cultivares dos grupos de maturações com numeração mais alta e, conseqüentemente, melhor adaptadas às regiões próximas ao Equador têm ciclo mais curto. Neste sentido, o ciclo de uma cultivar é menor em latitudes baixas (Norte do Brasil) e também em altitudes baixas. Cada alteração de um décimo de unidade no GM significa aproximadamente dois dias de variação no ciclo (EMBRAPA, 2013).

Os legumes (vagens) das sojas são levemente arqueados, pubescentes, formados por duas valvas de um carpelo simples, medindo cerca de 2 até 7cm, onde se aloja cerca de 1 até 5 sementes. As cores das vagens das sojas variam entre amarela-palha, cinza, marrons ou pretas, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta, tendo potencial para produzir até 400 vagens por planta, em condições normais de cultivo, todavia as cultivares nacionais apresentam em média de 30 a 80 vagens por planta (Sediyama et al., 2016).

Em termos de alturas das plantas, os mesmos podem variar de acordo com as condições do meio ambiente, clima, solo e de cada cultivar. A estatura ideal pode variar entre 60 a 110 cm, que pode facilitar a colheita mecânica e evitar o acamamento das plantas (Sediyama et al., 2016).

## **2.2. Importância da cultura da soja**

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a estimativa do aumento populacional é de 9,5 bilhões de habitantes em 2050, com consequentes aumentos na demanda mundial de alimentos; aumentos esses associados a maiores rendas per capita e à crescente taxa de urbanização em especial nos países em desenvolvimento.

A estimativa da produção mundial de soja para a safra 2017/18 foi de cerca de 348,6 milhões de toneladas, e se comparada à safra anterior, houve uma redução de cerca de 0,6%. A produção mundial será de 2,70 milhões de toneladas a menos que na safra 2016/17, sendo os Estados Unidos com 33,00%, o Brasil com 32,00% e a Argentina com 17,00%; responsáveis em conjunto por 82,00% da safra mundial (FIESP, 2018).

O estado do Mato Grosso com a produção total de 29.082,5 milhões toneladas e área semeada de 9.259,0 milhões hectares e produtividade de 3.141 kg ha<sup>-1</sup> na safra 2016/17 foi o maior estado produtor da oleaginosa, seguido pelo estado do Paraná com produção de 17.024,9 milhões toneladas, com área semeada de cerca 5.244,9 milhões hectares e produtividade de 3.246 kg ha<sup>-1</sup>, seguido do estado do Rio Grande do Sul, Goiás e Mato Grosso do Sul, com produção de 17.024,9, 15.381,0 e 7.868,0 milhões toneladas, respectivamente. Assim os cinco maiores estados produtores de soja, totalizaram cerca de 76,62% da safra brasileira de grãos. Em Minas Gerais, a área cultivada atual de soja é de cerca 1,5 milhões de hectares e uma produtividade média de 3.400 kg ha<sup>-1</sup>, totalizando cerca de 5 milhões de toneladas. Os estados do MATOPIBA (Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia) contribuem com aproximadamente 11,44% da safra total, com crescimento a cada ano, principalmente em áreas de pastagens degradadas (CONAB, 2018).

Quanto às exportações mundiais, os números para 2019 indicam que o Brasil será novamente o maior exportador de soja em grãos do mundo com cerca de 67,00 milhões de toneladas, sendo assim, responsável por 41,93% de todas as exportações mundiais do grão. Os Estados Unidos vêm em segundo lugar com cerca de 40%, com 58,80 milhões de toneladas e a Argentina em terceiro colocado com 6,66%, sendo a maior parte da soja processada internamente com a exportação de apenas 8,8 milhões de toneladas. Juntos esses três países são responsáveis por 88,46% de todas as exportações mundiais de soja (FIESP, 2018).

### 2.3. Soja Enlist E3™

Visando reduzir os impactos causados pelo uso constante de um mesmo ingrediente ativo, uma nova cultivar de soja geneticamente modificada (GM) foi desenvolvida pela MS Technologies e Dow AgroSciences LLC (Fast et al., 2016). Essa cultivar, evento DAS-44406-6 x DAS-81419-2, foi aprovada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) para plantio, consumo humano e animal (CTNBio, 2017). Contudo, vale ressaltar que mesmo com a aprovação da CTNBio, a empresa detentora da patente dessa cultivar ainda necessita da autorização e registro junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para então comercializar o produto no país.

A nova cultivar é denominada de Enlist E3™ e foi desenvolvida usando transformação mediada por *Agrobacterium* para incorporar de forma estável o gene AAD-12 de *Delftia acidovorans*, os 2mEPSPS de *Zea mays* e o gene PAT de *Streptomyces viridochromogenes*, em soja, visando a tolerância aos herbicidas 2,4-D, glyphosate e glufosinato de amônio, respectivamente (Papineni et al., 2017; Fast et al., 2016). Segundo Papineni et al. (2017), o gene AAD-12 que codifica a enzima ariloxalcanoato dioxigenase-12 (AAD-12), quando expressada nas plantas, degrada o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em 2,4-diclorofenol (DCP; herbicida inativo), promovendo, assim, a tolerância ao 2,4-D. O gene 2mEPSPS, codifica uma dupla proteína de 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintase de milho mutante. Essa proteína, quando codificada é insensível ao glyphosate, proporcionando assim, tolerância ao glyphosate em plantas que expressam a proteína 2mEPSPS. Além destes, essa cultivar também é composta pelo gene PAT, que expressa a fosfinotricina acetil-transferase e promove a tolerância aos herbicidas de glufosinato de amônio.

Diante da nova tecnologia Enlist, há grande carência de informações a respeito do comportamento fisiológico dessa cultivar submetida à aplicação de herbicidas e suas combinações á base de glyphosate, 2,4-D e glufosinato de amônio.

## 2.4. Mecanismo de ação dos herbicidas

### 2.4.1. Glufosinato de amônio

Amonium - DL - homoalanin -4-yl- (methyl) phosphinate, nome comum do amônio glufosinato, é um herbicida amplamente utilizado na agricultura em escala mundial, em função tanto da alta eficácia quanto do amplo espectro de controle de plantas daninhas. Possui duas formas, a ativa, que tem ação herbicida (LPhosphinothricin) e a inativa (DPhosphinothricin). Foi inicialmente isolado de *Streptomyces viridochromogenes* (Bayer et al., 1972).

A glutamina sintetase, considerada a via de assimilação do nitrogênio, é a enzima alvo de inibição dessa rota, uma vez que ela pode ser inibida utilizando-se concentrações baixíssimas de glufosinato (Lea e Ridley, 1989; Kruckberg et al., 1989). Plantas tratadas com o amônio glufosinato mostram rápido acúmulo de amônia, associado à destruição de cloroplastos, redução dos níveis de fotossíntese e redução na produção de aminoácidos, resultando na inibição da fotossíntese e morte celular (Sauer et al., 1987). Os principais sintomas que as plantas mostram após a aplicação de amônio glufosinato são: rápida clorose do tecido tratado, seguido de necrose e morte das plantas após poucos dias.

Apesar do amônio glufosinato ser um herbicida não seletivo, existem relatos descrevendo diferentes respostas de suscetibilidade de plantas daninhas, onde as causas podem ser explicadas por diferenças na translocação, absorção e metabolismo (Everman et al., 2009; Skora-Neto et al., 2000; Pline et al., 1999).

O ingrediente ativo amônio glufosinato é um substrato análogo ao glutamato, inibindo a enzima glutamina sintetase (GS; E. C. 6.3.1.2), uma enzima central no metabolismo da amônia em plantas (Manderscheid e Wild, 1986). Ele compete pelos locais em que o glutamato se liga à glutamina sintetase onde, uma vez que o glufosinato tem sucesso, a ligação se torna irreversível (Logusch et al., 1991). A irreversível ligação entre o amônio glufosinato e a glutamina sintetase resulta em rápida acumulação, em níveis tóxicos, de amônia dentro da célula (Kishore e Shah, 1988; Tachibana et al., 1986).

Estudos apontam diferenças entre suscetibilidade de plantas ao amônio glufosinato, tanto por diferenças de movimento (absorção e translocação) quanto por metabolismo (Everman et al., 2009b; Steckel et al., 1997; Skora-Neto et al., 2000).

Na maioria das espécies em que a absorção do glufosinato foi estudada, o pico de absorção é atingido após 24 horas de sua aplicação (Sellers et al., 2004). Devido à similaridade do amônio glufosinato com aminoácidos como o glutamato, acredita-se que sua absorção seja realizada por meio de cotransportadores de prótons (Ullrich et al., 1990). Sua ação é dependente de luz em diversas plantas daninhas (Wild e Manderscheid, 1984; Kocher, 1983).

Apesar de ter propriedades físicoquímicas para ter mobilidade no floema das plantas a translocação do glufosinato é muito pequena. Porém é possível identificar diferença de translocação entre as plantas consideradas mais tolerantes e as mais suscetíveis, da qual as últimas possuem maior translocação (Shelp et al., 1992). Existem diversas teorias para explicar a baixa mobilidade do glufosinato. (Beriault et al., 1999; Sauer et al., 1987; Zeigler; Wild, 1989). Uma delas pode ser devido à imediata inibição da glutamina sintetase, culminando com acúmulo de amônia nas células e diminuição de glutamina. O acúmulo de amônia causa ruptura das membranas celulares, causando a morte dos tecidos antes mesmo de o glufosinato ser transportado para o floema (Tachibana et al, 1986).

#### **2.4.2. Glyphosate**

O glyphosate (N-fosfometil glicina) é um potente herbicida de pós-emergência, largo espectro, não seletivo, capaz de controlar efetivamente um grande espectro de plantas daninhas (Franz, 1985; Quinn, 1993; Gruys e Sikorski, 1999)

Quando o glyphosate é aplicado sobre as plantas, ocorre inicialmente uma rápida penetração, seguida por uma longa fase de lenta penetração, sendo que a duração dessas fases depende de numerosos fatores, incluindo espécie, idade, condições ambientais e concentração do glyphosate e surfactante. O glyphosate é móvel no floema e é rapidamente translocado por todas as partes da planta, mas tende a se acumular nas regiões meristemáticas. Foi sugerido que as cargas negativas da parede celular e do plasmalema repelem o glyphosate, fortemente aniônico. Essa falta de uma forte ligação pode contribuir para o movimento do glyphosate no apoplasto, ou seja, ele apresenta movimentação tanto simplástica como apoplástica. O herbicida pode penetrar na planta através de outras rotas.

Através do simplasto, o glyphosate aplicado nas folhas (fonte) é translocado para as regiões em crescimento no restante da planta (dreno), juntamente com os fotoassimilados (Peterson et al., 1978). Os sintomas comuns observados após a aplicação de glyphosate são clorose foliar seguida de necrose. Outros sintomas foliares são: enrugamento ou malformações (especialmente nas áreas de rebrotamento) e necrose de meristema e também de rizomas e estolões de plantas perenes. Em contraste com muitos herbicidas de contato, os sintomas fitotóxicos de danos pelo glyphosate geralmente desenvolvem-se lentamente, com a morte ocorrendo após vários dias e mesmo semanas. Devido ao longo tempo requerido, a estabilidade *in vivo* do glyphosate é uma importante característica que contribui para seus efeitos fitotóxicos irreversíveis. Nas plantas, o glyphosate é muito estável, com pequena degradação detectável ocorrendo em longo período de tempo (Gruys e Sikorski, 1999).

O mecanismo de ação do glyphosate é bastante singular porque ele é o único herbicida capaz de inibir especificamente a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPs) que catalisa a condensação do ácido chiquímico e do fosfato piruvato, evitando, assim, a síntese de três aminoácidos essenciais – triptofano, fenilalanina e tirosina (Jaworski, 1972; Zablotowicz e Reddy, 2004).

As enzimas EPSPs de todas as plantas, fungos e da maioria das bactérias isoladas e caracterizadas até hoje são inibidas pelo glyphosate. O glyphosate é um potente inibidor submicromolar da enzima EPSPs. As bactérias que superproduzem a EPSPs podem se desenvolver na presença de concentrações que seriam tóxicas para outros organismos. Assim, a transferência de gene com tolerância ao glyphosate a uma planta suscetível confere, a esta, a tolerância ao glyphosate (Gruys e Sikorski, 1999).

A interrupção da biossíntese dos aminoácidos aromáticos de plantas é uma estratégia atrativa para o desenvolvimento de herbicida com características ambientais favoráveis. Isto porque, apesar da rota do chiquimato estar presente em plantas e em muitos microrganismos, ela é completamente ausente em mamíferos, peixes, pássaros, répteis e insetos. Estas formas de vida não dependem da rota do chiquimato porque retiram da dieta os produtos aromáticos que necessitam. Já as

plantas são obrigadas a produzir estes aminoácidos essenciais para sobreviver e se multiplicar (Gruys e Sikorski, 1999).

### **2.4.3. 2,4-Diclorofenilacético**

O 2,4-D (ácido 2,4- diclorofenilacético) é um herbicida altamente seletivo, sistêmico, pós-emergente. Uma vez absorvido, é translocado dentro da planta, acumulando-se nos pontos crescentes das raízes e agindo pelo crescimento desordenado das células, impedindo o transporte de água e nutrientes através da planta (2,4-D: FACT SHEET, 2000). Pertence à família dos compostos fenólicos, sendo sais ou ésteres de elevado peso molecular e baixa volatilidade, derivados do ácido fenoxiacético (Saad, 1978).

É utilizado como herbicida por apresentar seletividade para plantas de folhas estreitas, tendo maior intoxicação para espécies latifoliadas, sendo bastante utilizado em plantio direto, principalmente em mistura com outros herbicidas, como o glyphosate, na dessecação de plantas daninhas antes da semeadura da soja. A seletividade ocorre por mecanismos fisiológicos (Saad, 1978), possivelmente porque em dicotiledôneas essa auxina sintética não é metabolizada tão rapidamente quanto à auxina endógena, enquanto monocotiledôneas podem rapidamente inativar auxinas sintéticas por conjugação (Taiz e Zeiger, 2004).

Sua toxidez se manifesta por meio de vários efeitos: epinastia das folhas, interrupção do crescimento e formação de necroses e raízes secundárias. Segundo Hanson e Slife (1961), citados por Ashton e Crafts (1973), quando plântulas de espécies susceptíveis são pulverizadas com 2,4-D o padrão de crescimento normal muda rapidamente: células meristemáticas param de se dividir, células em alongamento cessam o crescimento em comprimento, mas mantêm a expansão radial.

Segundo Saad (1978), os principais efeitos do 2,4-D na planta são encarquilhamento das folhas, encurvamento da folha sobre a face inferior, as hastes se curvam para o solo e se tornam rígidas (às vezes trincadas) ou aumentam de volume em quase toda sua extensão, as cascas se fendem e dentro dessas fissuras aparecem galhos e raízes, os rebentos em desenvolvimento param de crescer, há o

aparecimento de órgãos mal constituídos e as plantas perdem sua coloração verde, amarelecem e morrem.

Um fator importante a ser considerado no uso de 2,4-D é a sua persistência no solo, a qual apesar de ser considerada de curta a média e o período residual não exceder quatro semanas em solos argilosos e clima quente, quando aplicado em dosagens comerciais (Silva et al., 2007).

## **2.5. Estresse oxidativo e sistemas de defesa antioxidante**

O emprego dos herbicidas de forma incorreta tem impactos negativos consideráveis sobre o meio ambiente e a saúde humana (Bennett et al., 2004). Adicionalmente, os herbicidas devem ser criteriosamente selecionados e aplicados de acordo com suas funções de interromper processos essenciais nas plantas (por exemplo, a fotossíntese e biossíntese de aminoácidos) que pode ser compartilhado tanto pela cultura em questão quanto pelas plantas daninhas (Sandhu et al., 2002; Mulwa; Mwanza., 2006). Mesmo que um determinado ingrediente ativo seja seletivo para determinada cultura e não cause danos substanciais às plantas, alterações bioquímicas e fisiológicas podem ocorrer, como um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Song et al., 2007).

Em condições normais, as ERO são geradas pelo metabolismo dos organismos aeróbicos, principalmente através da fotossíntese e respiração, porém mantidos em níveis basais através de sistemas antioxidantes de defesa (Gratão et al., 2005). A produção das ERO pode ser intensificada devido a exposição das plantas à estresses abióticos como temperaturas extremas (Gaveliene et al., 2013), metais pesados (Gratão et al., 2012), déficit hídrico (Jeyaramraja; Thushara, 2013), altas concentrações salinas (Ellouzi et al., 2011), aplicação de herbicidas (Zabalza et al., 2007; Zobiole et al., 2010), entre outros.

No entanto, quando há um desequilíbrio entre produção e eliminação de ERO, desencadeiam-se danos às proteínas e aos ácidos nucleicos, além da peroxidação de lipídios de membrana, podendo levar as células do organismo à morte (Miller et al., 2010).

Vários mecanismos são utilizados para eliminar e/ou desintoxicar as ERO nas plantas, como os sistemas antioxidantes de defesa enzimáticos e não enzimáticos

(Marquez-Garcia et al., 2011; Azevedo et al., 2012; Gallego et al., 2012). No sistema enzimático, destacam-se: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a ascorbato peroxidase (APX), bem como peroxidases não específicas quanto ao doador de elétrons, como a guaiacol peroxidase (GPOX). Estas enzimas atuam com o objetivo de impedir a ação tóxica das ERO (Deuner et al., 2008; Barbosa et al., 2014). O sistema de defesa antioxidante não-enzimático compreende os compostos como a glutathiona (GSH), o ascorbato (AsA), alcalóides, fenóis, tocoferóis, carotenóides e prolina (Gratão et al., 2005).

Entre as enzimas que compõem o sistema de defesa antioxidante enzimático, inclui a superóxido dismutase (SOD - EC 1.15.1.1). Esta enzima faz parte de um grupo de metaloproteínas que catalisam a formação de  $H_2O_2$  a partir do radical superóxido ( $O_2^-$ ), sendo a única enzima cuja atividade controla a concentração de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ , substratos da reação de Haber-Weiss, desempenhando, papel central no mecanismo de defesa ao prevenir a formação do radical  $OH^*$  (Bowler et al., 1992). Esta enzima é considerada a primeira linha de defesa contra as ERO nas células (Scandalios, 2005). Três classes de SODs foram encontradas em plantas e classificadas de acordo com seu co-fator metálico: manganês (Mn), cobre/zinco (Cu/Zn) ou ferro (Fe) (Alscher et al., 2002). As Mn-SODs estão localizadas nas mitocôndrias e peroxissomos, mas também foram encontradas nos cloroplastos de algumas plantas (Hayakawa et al., 1984). As Fe-SODs são encontradas em um número limitado de espécies vegetais e estão localizadas nos cloroplastos (Alscher et al., 2002). As Cu/Zn-SODs são as mais abundantes em folhas verdes e são encontradas no citosol, nos cloroplastos e peroxissomos (Del Rio et al., 2002).

A catalase (CAT – EC 1.11.1.6) é uma enzima tetramétrica Ferro porfirina que catalisa a conversão de  $H_2O_2$  em água e  $O_2$  liberado durante a transformação do glicolato a glioxalato durante a fotorrespiração (Igamberdiev; Lea, 2002) ou durante a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (Holtman et al., 1994). A CAT possui baixa afinidade pelo  $H_2O_2$  requerendo a ligação de duas dessas moléculas para que a reação ocorra. Sendo assim, a CAT provavelmente apresenta função na remoção do excesso de ERO durante a condição de estresse (Gratão et al., 2005), além de proteger a SOD da inativação por altos níveis de  $H_2O_2$  (Fridovich, 1995). Em baixas concentrações de  $H_2O_2$  ( $< 1 \mu M$ ) a CAT apresenta função peroxidativa, onde o Fe

interage com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  formando peróxido de Fe, este pode ser reduzido por doadores de hidrogênio (H), como o ácido ascórbico. Em elevadas concentrações a CAT possui função catalítica formando  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  (Scandalios, 2005).

A ascorbato peroxidase (APX – EC 1.11.1.11) é uma heme peroxidase encontrada nos cloroplastos, citosol, mitocôndrias e peroxissomos (Asada, 1999). Assim como a CAT, a APX converte o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e  $\text{O}_2$ , contudo, apresentam afinidades diferentes por essa ERO. A APX demonstra afinidade pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  na ordem de micromolar, enquanto a CAT milimolar. Assim, a APX parece ser responsável pela fina regulação da resposta as ERO (Mittler, 2002), todavia tem elevada importância na proteção contra o dano oxidativo em compartimentos subcelulares onde a CAT não está presente, como os cloroplastos, onde são encontradas duas isoformas, sendo uma ligada ao tilacóide e a outra dispersa no estroma (Asada, 1999). A APX reduz o  $\text{H}_2\text{O}_2$  à água utilizando o ascorbato como doador de elétrons. Neste processo, um intermediário de dois elétrons oxidados da APX é formado, este oxida o ascorbato produzindo duas moléculas de monodehidroascorbato sendo, então, reduzido novamente (Asada, 1999).

Por outro lado, as glutathione-S-transferases (GST, EC 2.5.1.18) são muitas vezes conhecidas como enzimas de desintoxicação e, de fato, elas foram descobertas pela primeira vez por sua capacidade de metabolizar uma ampla variedade de compostos exógenos (xenobióticos), via conjugação glutathione (Mannervik e Danielson, 1988). O nível de glutathione é conhecido por correlacionar com plantas que apresentam tolerância de xenobióticos (May et al., 1998). Uma característica da GST é a elevada especificidade pela glutathione reduzida (GSH); após combinada, apresenta maior especificidade para um segundo substrato. A GSH, formada pelos aminoácidos glicina, cisteína e glutamato, é o co-fator para a GST. A capacidade redutora da GSH é determinada pelo grupamento SH, presente na cisteína. Considerada a principal enzima detoxificante da fase II, desempenha papel fisiológico na iniciação da detoxificação de potenciais agentes alquilantes, incluindo compostos farmacologicamente ativos, gerados intracelularmente ou encontrados na forma de xenobióticos. A reação de conjugação do grupo sulfidrílico da glutathione com grupos eletrofílicos de compostos xenobióticos, catalisada pela GST, torna os produtos da reação menos tóxicos e mais solúveis em água,

facilitando a excreção (Lam et al., 1982; Lam et al., 1994; Wattenberg, L.M, 1983; Wheatley et al., 1994).

O presente estudo teve como objetivos: verificar as respostas da produtividade, morfológicas (altura das plantas, altura da inserção da primeira vagem, número de vagens e diâmetro do caule) e respostas bioquímicas (SOD, APX, CAT e GST) da Soja Enlist E3™ submetida à aplicação de diferentes herbicidas.

### 3. REFERÊNCIAS

**2,4-D:** Fact sheet. Disponível em: <<http://www.gn.apc.org/pesticidestrust.afacts/24d.htm>>. Acesso em: 17 jun. 2019.

Aliprandini, L.F.; A. Krensk, H.L. Gabe. 2009. Spring: **Um cultivar de super-precoce para o sul do Brasil**. (Abstract.) p. 57. In EMBRAPA (ed.) Reunião de soja da Região Central do Brasil, 24. EMBRAPA, São Pedro, Brasil.

Alscher, RG; Erturk, N.; Heath, LS. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, 53, 1331e1341.

Alvino, CA; Gricio, LH.; Sampaio, FA; Giroto, M.; Felipe, ALS; Junior, CEI.; Bueno, CE. MS.; Bosquê, GG; Lima, FCC. Interferência e controle de plantas daninhas nas culturas agrícolas. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 10, n. 20, p. 1-4, 2011.

[http://faef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/8PS4j9vvbVATTby\\_2013-5-17-17-29-45.pdf](http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/8PS4j9vvbVATTby_2013-5-17-17-29-45.pdf)

Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of reactive oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Biology**, 50(1), 601-639.

Ashton, FM; Crafts, AS. **Mode of action of herbicides**. New York: John Wiley, 1973. 504p.

Azevedo, RA; Gratão, PL; Monteiro, CC; Carvalho, RF (2012). What is new in the research on cadmium induced stress in plants? **Food and Energy Security**, 1(2), 133-140.<http://doi.org/10.1002/fes3.10>.

Barbosa, MR; Silva, MM. de A.; Ulisses, LWC; Camara, TR. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, p. 453-460, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782014000300011>

Bayer, E. et al. Stoffwechselprodukte von mikroorganismen. phosphinothricin und phosphinothricin-alanyl-alanin. **Helvetica Chimica Acta**, v.55, n.1, p.224-239, 1972.

Benedetti, JGR; Pereira, L; Alves, PLCA; Yamauti, MS. Período anterior à interferência de plantas daninhas em soja transgênica. **Scientia Agraria**, v. 10, n. 4, p. 289-295, 2009. <http://www.redalyc.org/html/995/99515590005>

Bennett, R; Phipps, R; Strange, A; Grey, P(2004). Environmental and human health impacts of growing genetically modified herbicide tolerant sugar beet: a life-cycle asses sment. **Plant Biotechnology Journal**, 2(4), 273–278.

Bowler, C; Van Montagu, M; Inzé, D (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, 43(1), 83-116.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. V. 4- SAFRA 2017/18- N. 7 - Sétimo levantamento, abril 2018. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/index.php/info-agro/safras/graos>

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Grãos. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**. 2018. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em: 23/11/2019.

CTNBio. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações – MCTIC. 204ª Reunião Ordinária da CTNBio-Agosto/2017. Disponível: <http://www.ctnbio.mcti.gov.br/deliberacoes>. Acesso: 23/02/2019.

Del Rio, LA; Corpas, FJ; Scandalio, LM; Palma, JM; Gomez, M; Barroso, JB (2002). Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, 53, 1255–1272.

Deuner, S; Alves, JD; Fries, DD; Zanandrea, I; Lima, AA; Henrique, P de C et al. Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro. **Revista Ceres**, v. 55, p. 135-140, 2008.

Ellouzi, H; Benhamed, K; Jana, C; Munné-Bosch, S; Abdelly, C (2011). (2011). Early effects of salt stress on the physiological and oxidative status of *Cakile maritima* (halophyte) and *Arabidopsis thaliana* (glycophyte) seedlings. **Plant Physiology**, 16, 128–143

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA. **Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste. Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil** - 2017. Londrina, 2013. 266p.

Everman, W. et al. Absorption, translocation, and metabolism of <sup>14</sup>C glufosinate in glufosinate-resistant corn, goosegrass (*Eleusine indica*), large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*), and sicklpod (*Senna obtusifolia*). **Weed Science**, v.57, n.1, p.1-5, 2009.

Fast, BJ; Galan, MP; Schafer, AC. Event DAS-444Ø6-6 soybean grown in Brazil is compositionally equivalent to non-transgenic soybean. **GM Crops & Food**, v. 7, n. 2, p. 79–83, 2016. <https://doi.org/10.1080/21645698.2016.1184815>

FEDERAÇÃO DAS INDUSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO-FIESP. Safra Mundial de Soja 2017/18 - 11º Levantamento do USDA. <http://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-soja>. Acesso em: 4 de abril de 2019.

Franz, JE. Discovery, development and chemistry of glyphosate. In: Grossbard, E.; Atkinson, D. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p. 3-17.

Fridovich, I (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual review of biochemistry**, 64(1), 97-112.

Gallego, SM; Pena, LB; Barcia, RA; Azpilicueta, CE; Iannone, MF; Rosales, EP; Zawoznik, MS; Groppa, MD; Benavides, MP (2012). Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, 83, 33–46.

Gava, R. **Os efeitos de estresse hídricos na cultura da soja**. Tese. Esalq. Piracicaba, 2014.123p.

Gaveliene, V; Novickiene, L; Kyte, LP (2013). Effect of auxin physiological analogues on rapeseed (*Brassica napus*) cold hardening, seed yield and quality. **Journal of Plant Research**, 126(2), 283–292.

Gratão, PL; Monteiro, CC; Carvalho, RF; Tezotto, T; Piotto, FA; Peres, LEP; Azevedo, RA (2012). Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, 56, 79-96. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.04.009>.

Gratão, PL; Polle, A; Lea, PJ; Azevedo, RA. (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, 32, 481–494.

Hammer, DJ; Stoltenberg, DE; Colquhoun, JB; Conley, SP. Has Breeding Improved Soybean Competitiveness with Weeds. **Weed Science**, p. 1-5, 2017. <https://doi.org/10.1017/wsc.2017.60>

Hanson, JB; Slife, FW. How does 2,4-D kill a plant? **Illinois Research** v.3, n.3, p.3-4, 1961.

Hayakawa, T, Kanematsu, S, Asada, K (1984). Occurrence of Cu, Zn-superoxide dismutase in the intra thylakoid space of spinach chloroplasts. **Plant and cell physiology**, 25(6), 883-889.

Holtman, WL, Heistek, JC, Mattern, KA, Bakhuizen, R, Douma, AC. (1994).  $\beta$ -Oxidation of fatty acids is linked to the glyoxylate cycle in the aleurone but not in the embryo of germinating barley. **Plant Science**, 99(1), 43-53.

Igamberdiev, AU; Lea, PJ (2002). The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organism, **Phytochemistry**, 60(7), 651-674.

Jaworski, EG. Mode of action of N-phosphonomethylglycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 20, p. 1195-1198, 1972.

Jeyaramraja, PR; Thushara, SS (2013). Sequence of physiological responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) subjected to soil moisture deficit. **Photosynthetica**, 51(3), 395-403.

Kishore, GM; shah, D. M. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. **Annual Review of Biochemistry**, v.57, n.4, p.627-663, 1988.

Kocher, H. Influence of the light factor on physiological effects of the herbicide Hoe 39866. **Aspects of Applied Biology**, v.4, n.4, p.227-234, 1983.

Kruckberg, AL et al. Reduced activity mutants of phosphoglucose isomerase in the chloroplast and cytosol of *Clarkia xantiana*. **Biochemistry Journal**, v.261, n.1, p.457-467, 1989.

Lam, LKT; Spornins, VL; Wattenberg, LW. Isolation and identification of kahweol palmitate and cafestol palmitate as active constituents of green coffee beans that enhance glutathione s-transferase activity in the mouse. **Cancer Res.** v. 42, p. 1193-1198, 1982.

Lam, LKT; Zhang, J; Zhang, F; Zhang, B. Inhibition of chemically induced carcinogenesis by 2- n-heptylfuran and 2-n-butylthiophene from roast beef aroma In: Mussinan, C. J.; Keelan, M. E, (Eds). **Sulfur Compounds in Food**. Washington, DC: ACS Symposium Series ,1994. p. 278-291.

Lea, P; ridley, S.M. Glutamine synthetase and its inhibitors. In: DODGE, A.D. (ed.) **Herbicides and Plant Metabolism**. Cambridge: **University Press**. p.137-170, 1989.

Logusch, EW et al. Inhibition of plant glutamine synthetases by substituted phosphinothricins. **Plant Physiology**, v.95, n.4, p.1057-1062, 1991.

Manderscheid, R; WILD, A. Studies on the mechanism of inhibition by phosphinothricin of glutamine synthetase isolated from *Triticum aestivum* L. **Journal of Plant Physiology**, v.123, n.2, p.135-142, 1986.

Mannervik, B; Danielson, UH. Glutathione transferases - structure and catalytic activity. **CRC Crit. Rev. Biochem.**, Boca Raton, v. 23, p. 283-337, 1988.

Márquez-García, B; Horemans, N; Cuypers, A; Guisez, Y; Córdoba, F (2011). Antioxidants in *Erica andevalensis*: a comparative study between wild plants and cadmium- exposed plants under controlled conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, 49, 110–115.

Matsuo, E; Ferreira, SC; Sedyama, T. Botânica e fenologia. In: sediyama, T.; Silva, F.; Borém, A. (Ed.). **Soja: do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2015. p. 27-53.

May, M et al. Review article. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. **J. Exp. Bot.**, Oxford, v. 49, p. 649-667, 1998.

Miller, G; Suzuki, N; Ciftci-Yilmaz, S; Mittler, R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell & Environment**, Malden, v.33, p.453-467, 2010.

Mittler, R (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, 7(9), 405-410.

Mulwa, RMS; Mwanza, LM (2006) Biotechnology approaches to developing herbicide tolerance/selectivity in crops. **African Journal of Biotechnology**, 5, 396–404.

Nepomuceno, AL; Farias, JRB; Neumaier, N. **Características da soja**. Embrapa-CNPSo, 2008. Disponível em: < <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soia/arvore/CONTAGQ124271020069131.html>>. Acesso em: 5 de abril de 2019.

Nepomuceno, M; Alves, PLCA.; Dias, TCS; Pavani, MCMD. Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura da soja nos sistemas de semeadura direta e convencional. **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p. 43-50, 2007. <http://www.scielo.br/pdf/pd/v25n1/a05v25n1>

Oerke, EC. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, v. 144, n. 1, p. 31–43. 2006. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>

Oliveira, RF; Pascholati, SF; Leite, B. Papilla formation and peroxidase activity in *Mimosa scabrella* hypocotyls inoculated with the non-pathogen *Colletotrichum graminicola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 195-197, jun. 1997.

Papineni, S; Murray, JA; Ricardo, E; Dunville, CM; Sura, RK, Thomas, J. Evaluation of the safety of a genetically modified DAS-444Ø6-6 soybean meal and hulls in a 90-day dietary toxicity study in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 109, n. 1, p. 245-252, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.048>

Peterson, CA; De Wildt, PPO.; Edgington, CV. A rationale for the ambimobile translocation of the nematocidal oxyamyl in plants. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 8, p. 1-9, 1978.

Pline, WA; wu, J.; hatzios, K.K. Absorption, translocation, and metabolism of glufosinate in five weed species as influenced by ammonium sulfate and pelargonic acid. **Weed Science**, v.47, n.3, p.636-643, 1999.

Quinn, JP. Interactions of the herbicides glyphosate and glufosinate (phosphinothricin) with the soil microflora. In: ALTMAN, J. (Ed.) **Pesticides interactions in crop production** - beneficial and deleterious effects. Boca Raton: CTC Press, 1993. p. 245-265.

Rincker, K; Nelson, R; Specht, J; Sleper, D; Cary, T; Cianzio, SR; Casteel, S; Conley, S; Chen, P; Davis, V et al. Genetic improvements of U.S. soybean in maturity groups II, III, and IV. **Crop Science**, v. 54, n. 4, p. 1419–1432, 2014. <https://doi.org/10.2135/cropsci2013.10.0665>

Saad, O. **A vez dos herbicidas**. 2.ed. São Paulo: Nobel, 1978. 267p.

Saberali, SF; Mohammadi, K. Organic Amendments Application Down weight the Negative Effects of Weed Competition on the Soybean Yield. **Ecological Engineering**, v. 82, n. 1, p. 451-458, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.05.038>

Sandhu, SS; Bastos, CR; Azini, LE; Neto, AT; Colombo, C. (2002) RAPD analysis of herbicide-resistant Brazilian rice lines produced via mutagenesis. **Genet. Mol. Res**, 1(4), 359–370.

Sauer, H; wild, A.; rühle, W. The effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis. II. The causes of inhibition of cell photosynthesis. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v.42, n.3, p.270-278, 1987.

Sauer, H; wild, A.; rühle, W. The effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis. II. The causes of inhibition of cell photosynthesis. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v.42, n.3, p.270-278, 1987.

Scandalios, JG (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 38(7), 995-1014.

Sediyama, T; Teixeira, RC; Barros, HB. Origem, evolução e importância econômica. In: SEDIYAMA, T. (Ed.). **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Mecenas, 2009, p. 1-5.

Sediyama, T; Oliveira, RCT; Sediyama, HA. A soja. **Produtividade da Soja**. Mecenas: Londrina, 2016. p. 11-18.

Sellers, BA; smeda, R.J.; LI, J. Glutamine synthetase activity and ammonium accumulation in influenced by time of glufosinate application. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.78, v.3, p.9- 20, 2004.

Shelp, BJ; swanton, C.J.; hall, J.C. Glufosinate (phosphinothricin) mobility in young soybean shoots. **Journal of Plant Physiology**, v.139, n.1, p.626-628, 1992.

Silva, AA. et al. Herbicidas: classificação e mecanismo de ação. In: Silva, AA; silva, JF. (Eds.) **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. p. 83-148.

Silva, AF; Concenço, G; Aspiazú, I; Ferreira, EA; Galon, L; Freitas, M. A. M.; Silva, AA; Ferreira, FA. Período anterior à interferência na cultura da soja-RR em condições de baixa, média e alta infestação. **Planta daninha**, v. 27, n. 1, p. 57-66, 2009. <http://www.scielo.br/pdf/pd/v27n1/a09v27n1>

Skora-Neto, F.; coble, H.; corbin, F. Absorption, translocation and metabolism of <sup>14</sup>C-glufosinate in *Xantium strumarium*, *Commelina diffusa*, and *Ipomoea purpurea*. **Weed Science**, v.48, n.2, p.171-175, 2000.

Soltani, N; Dille, JA; Burke, IC; Everman, WJ; Vangessel, MJ; Davis, VM; Sikkema, PH. Perspectives on Potential Soybean Yield Losses from Weeds in North America. **Weed Technology**, v. 31, n. 1, p. 148-154, 2017. <https://doi.org/10.1017/wet.2016.2>

Song, J; Kim, J; Im, J; Lee, K; Lee, B; Kim, D. The Effects of Single- and Multiple-Weed Interference on Soybean Yield in the Far-Eastern Region of Russia. **Weed Science**, v. 65, n. 3, p. 371-380, 2017. <https://doi.org/10.1017/wsc.2016.25>

Song, NH; Le Yin, X; Chen, GF; Yang, H (2007). Biological responses of wheat (*Triticum aestivum*) plants to the herbicide chlorotoluron in soils. **Chemosphere**, 68(9), 1779-1787.

Specht, JE; Diers, BW; Nelson, RL; Francisco, J; Toledo, F; Torrion, JA; Grassini, P. Soybean. In: Smith, S; Diers, B; Specht, J; and Carver, B; editors, Yield gains in major U.S. field crops. **CSSA Spec. Publ. 33**. ASA, CSSA, and SSSA, Madison. p. 311-356, 2014. <https://doi.org/10.2135/cssaspecpub33.c12>

Steckel, GJ; hart, S.E.; wax, L.M. Absorption and translocation of glufosinate on four weed species. **Weed Science**, v.45, n.3, p.378-381, 1997.

Tachibana, K et al. Accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. **Journal of Pesticide Science**, v.11, n.1, p.33- 37, 1986.

Taiz, L; Zeiger, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

Ullrich, WR; ullrich-eberius, C.I.; kocher, H. Uptake of glufosinate and contaminant membrane potential changes in *Lemna gibba* G1. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.37, n.1, p.1-11, 1990.

USDA-NASS. US Department of Agriculture. **National Agricultural Statistics Service**. 2016. 2015 Agricultural Chemical Use Survey. Soybeans Disponível: [https://www.nass.usda.gov/Surveys/Guide\\_to\\_NASS\\_Surveys/Chemical\\_Use/2015\\_Cotton\\_Oats\\_Soybeans\\_Wheat\\_Highlights/ChemUseHighlights\\_Soybeans\\_2015.pdf](https://www.nass.usda.gov/Surveys/Guide_to_NASS_Surveys/Chemical_Use/2015_Cotton_Oats_Soybeans_Wheat_Highlights/ChemUseHighlights_Soybeans_2015.pdf) . Acesso em: 28/02/2019.

Vencill, WK; Nichols, RL; Webster, TM; Soteris, JK; Mallorysmith, C; Burgos, NR; Johnson, WG; McClelland, MR. Herbicide resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops. **Weed Science**, v. 60, (Special Issue 1), p. 2–30, 2012. <https://doi.org/10.1614/WS-D-11-00206.1>

Wattenberg, LM. Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. **Cancer Res** v. 43 (may), p. 2448s-2453s (Suppl.), 1983

Wheatley, JB; Kelley, MK; Montali, JA; Berry, COA; Schmidt, Jr., DE. Examination of glutathione S-transferase isoenzyme profiles in human liver using high-performance affinity chromatography. **J. Chromat. A** v. 663, p. 53-63, 1994.

Wild, R; Manderscheid, R. The effect of phosphinothricin on the assimilation of ammonia in plants. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v.39, n.3, p.500-504, 1984.

Zabalza, A; Gaston, S; Sandalio, LM; Ríio, LA; Royuela, M (2007). Oxidative stress is not related to the mode of action of herbicides that inhibit acetolactate synthase. **Environmental and Experimental Botany**, 59(2),150–159.

Zablotowicz, RM; Reddy, KN. Impact of glyphosate and *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis;with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. **Journal of Environmental Quality**, v. 33, p. 825-831, 2004.

Zeigler, C; Wild, A. The effect of bialaphos on ammonium-assimilation and photosynthesis. II. Effects on photosynthesis and photorespiration. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v.44, n.3, p.103-108, 1989.

Zobiole, LHS.; Oliveira, JRRS; Kremer, RJ; Constantin, J; Bonato, CM; Muniz, AS(2010). Water use efficiency and photosynthesis of glyphosate resistant soybean as affected by glyphosate. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 97(3), 182–193.

## **CAPÍTULO 2 – SELETIVIDADE E PRODUTIVIDADE DA SOJA ENLIST E3™ A APLICAÇÃO DE HERBICIDAS**

**RESUMO** - Visando reduzir os impactos causados pelo uso constante de um mesmo ingrediente ativo, principalmente a ocorrência de plantas daninhas resistentes, uma nova cultivar de soja geneticamente modificada foi desenvolvida. Entretanto, por ser uma cultivar recém criada, ainda carece de estudos desenvolvidos sob condições de campo quanto à resistência efetiva a herbicidas e nas diferentes condições de cultivo no Brasil. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi verificar os efeitos dos herbicidas 2,4-D sal colina, glyphosate, 2,4-D sal colina+glyphosate, glufosinato e glufosinato + 2,4-D sal colina sobre o desenvolvimento e a produtividade da soja Enlist E3™. Os tratamentos herbicidas foram: 2,4-D sal Colina (780 g e.a./ha<sup>-1</sup>), glyphosate (820 g e.a./ha<sup>-1</sup>), 2,4-D sal colina+glyphosate (1600 g e.a./ha<sup>-1</sup>), glufosinato (400 g e.a./ha<sup>-1</sup>) e glufosinato + 2,4-D sal colina (400+780 g e.a./ha<sup>-1</sup>) e o dobro da dose de cada tratamento. O trabalho foi desenvolvido no município de Jaboticabal, SP e o delineamento foi realizado em blocos casualizados, em esquema fatorial 5x2+T, sendo cinco tratamentos herbicidas, duas doses e uma testemunha capinada com quatro repetições. Após a aplicação dos herbicidas foram realizadas as avaliações de intoxicação das plantas até os 14 DAA, e na colheita foram avaliadas a altura das plantas, altura de inserção da primeira vagem, número de vagens, peso de 100 grãos e rendimento de grãos foram avaliadas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 1 ou 5% de probabilidade. Considerando os resultados obtidos pelas variáveis analisadas na safra 17/18, concluiu-se que os tratamentos utilizados interferiram negativamente no desenvolvimento da cultura apenas para a altura de inserção e número de vagens da soja, sendo que o dobro da dose influenciou negativamente na produtividade de grãos e na altura da planta. Por outro lado, na safra 18/19, os tratamentos utilizados interferiram negativamente apenas na altura da planta e na produtividade quando utilizados o dobro das

doses recomendadas. Portanto, a soja Enlist E3™, na maioria de suas características avaliadas, principalmente para rendimento de grãos, não foi afetada significativamente à aplicação dos diferentes herbicidas, quando utilizada a dose recomendada para a cultura.

**Palavras-chave:** *Glycine max*, 2,4-D, glyphosate, glufosinato, tolerância, rendimento.

## **CHAPTER 2 – SELECTIVITY AND PRODUCTIVITY OF ENLIST E3™ SOYBEAN TO THE HERBICIDE APPLICATION**

**Abstract** – In order to reduce the impacts caused by the constant use of the same active ingredient in the field and the occurrence of resistant weeds, a new genetically modified soybean cultivar was developed. However, as a recent elaborated cultivar, studies are scarce about field conditions regarding the effective resistance to herbicides and different cultivation conditions in Brazil. Thus, the main of this work was to verify the effects of the herbicides 2,4-D choline salt, glyphosate, 2,4-D choline salt + glyphosate, glufosinate and glufosinate + 2,4-D choline salt on development and productivity of the soybean Enlist E3™. The herbicide treatments were: 2,4-D Coline salt (780 g ea / ha<sup>-1</sup>), glyphosate (820 g ea / ha<sup>-1</sup>), 2,4-D Coline + glyphosate salt), Glufosinato (400 g ea / ha<sup>-1</sup>) and Glufosinato + 2,4-D Choline salt (400 + 780 g ea / ha<sup>-1</sup>) and twice the dose of each treatment. The experiment was performed in a randomized complete block in a 5x2 + T factorial scheme, with five herbicide treatments, two doses and one weed control, with four replications. The height of the plants, height of insertion of the first pod, number of pods, weight of 100 grains and yield of grains were evaluated. The data were submitted to analysis of variance by the F test and the means were compared by the Tukey test at 1 or 5% of probability level. Overall results for 2017/2018 harvest showed that treatments with once herbicide dose had a negative effects on insertion height and the number of soybean pods, whereas treatments with twice the dose had a negative effect in yield of grains and at plant height. On the other hand, only treatments with twice herbicide dose affected negatively height and plant

productivity for 2018/2019 harvest. Therefore, most of its evaluated characteristics in soybean Enlist E3™, mainly for yield of grains, were not affected to the application of the different herbicides, when the recommended dose was used.

**Keywords:** Glycine max, 2,4-D, glyphosate, glufosinate, tolerance, yield.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, com 32% do total produzido (USDA, 2018), e é considerado o maior exportador do produto, com cerca de 64,7 milhões de toneladas, sendo a China o principal consumidor (IGC, 2017). Isto pode estar relacionado a alguns fatores ambientais, como os estresses hídrico e térmico, e antropogênicos, como seleção de cultivares e o manejo adotado pelos produtores para o controle de pragas, doenças e plantas daninhas.

Segundo Song et al. (2017), o principal motivo do baixo rendimento da soja está relacionado a problemas ocasionados pelo manejo inadequado das plantas daninhas. Dentre as alternativas de controle de plantas daninhas, a mais adotada em todo o mundo é o controle químico, pois, segundo Alvino et al. (2011), há maiores vantagens por ser mais econômico e eficiente que os demais, principalmente em extensas áreas de cultivo com alta infestação de plantas daninhas.

A melhoria das culturas por meio da criação de plantas geneticamente modificadas aumentou substancialmente o rendimento da soja nos últimos 30 anos (Oerke, 2006; Rincker et al., 2014). Specht et al. (2014) estimaram que dois terços dos ganhos no rendimento da soja foram resultados de melhorias genéticas e que um terço foi resultado de melhorias agronômicas.

Com a inclusão de novas cultivares transgênicas resistentes a herbicidas, como a soja RR (Roundup Ready®), resistente ao glyphosate e a soja LL (Liberty Link®), resistente ao glufosinato de amônio, a soja tornou-se mais competitiva com as plantas daninhas, em parte devido ao aumento do vigor das plântulas, crescimento mais rápido e aumento da densidade de

semeadura. No entanto, o aumento da ocorrência de espécies de plantas daninhas resistentes ao glyphosate, com consequente escape ao controle, pode aumentar as perdas de rendimentos (Soltani et al., 2017).

Visando reduzir os impactos causados pelo uso constante de um mesmo ingrediente ativo, principalmente a ocorrência de plantas daninhas resistentes, uma nova cultivar de soja geneticamente modificada foi desenvolvida pela MS Technologies e Dow AgroSciences LLC (Fast et al., 2016). Essa cultivar, evento DAS-44406-6 x DAS-81419-2, foi aprovada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) para plantio, consumo humano e animal (CTNBio, 2017). Contudo, vale ressaltar que mesmo com a aprovação da CTNBio, a empresa detentora da patente dessa cultivar ainda necessita da autorização e registro junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para então comercializar o produto no país.

A nova cultivar tem sido denominada de Enlist E3™ e foi desenvolvida usando transformação mediada por *Agrobacterium* para incorporar de forma estável o gene AAD-12 da bactéria *Delftia acidovorans*, os 2mEPSPS de *Zea mays* e o gene PAT da bactéria *Streptomyces viridochromogenes*, em soja, visando a resistência aos herbicidas 2,4-D, glyphosate e glufosinato de amônio, respectivamente (Papineni et al., 2017; Fast et al., 2016). Por ser uma cultivar recém criada, ainda carece de estudos desenvolvidos sob condições de campo quanto à resistência efetiva a esses herbicidas e nas diferentes condições de cultivo no Brasil.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos dos herbicidas 2,4-D sal colina, glyphosate, 2,4-D sal colina+glyphosate, glufosinato e glufosinato + 2,4-D sal colina sobre o desenvolvimento e a produtividade da soja Enlist E3™.

#### **4. CONCLUSÃO**

A soja Enlist E3™, na maioria de suas características avaliadas, principalmente para rendimento de grãos, não foi afetada significativamente à aplicação dos herbicidas quando utilizada a dose e o dobro das doses recomendadas para a cultura. Portanto, a soja enlist E3™ é resistente aos herbicidas utilizados mesmo quando aplicados o dobro da dose recomendada.

## 5. REFERÊNCIAS

Alvino, CA; Gricio, IH; Sampaio, FA; Giroto, M; Felipe, ALS; Junior, CEI; Bueno, CEMS; Bosquê, GG; Lima, FCC. Interferência e controle de plantas daninhas nas culturas agrícolas. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 10, n. 20, p. 1-4, 2011.

Berlato, MA; Fontana, DC. Variabilidade interanual da precipitação pluvial e rendimento da soja no Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v. 7, n. 1, p. 119-125, 1999.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA (CTNBio). Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações – MCTIC. **204ª Reunião Ordinária da CTNBio-Agosto/2017.** Disponível: <http://www.ctnbio.mcti.gov.br/deliberacoes>. Acesso em: 23 fev. 2019.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Grãos. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. 2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em: 23 jan. 2019.

Correia, NM; Durigan, JC. Seletividade de diferentes herbicidas à base de glyphosate à soja RR. **Planta Daninha**, v. 25, n. 2, p. 375-379, 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 3.ed. Brasília, Embrapa, 2013. 353 p.

EWRC (European Weed Research Conclil). Report of the 3rd and 4th meetings of EWRC – Committee of methods in Weed Research. **Weed Res.**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 88, 1964

Fast, BJ; Galan, MP; Schafer, AC. Event DAS-444Ø6-6 soybean grown in Brazil is compositionally equivalent to non-transgenic soybean. **GM Crops & Food**, v. 7, n. 2, p. 79–83, 2016.

Fehr, WR; Caviness, CE; Burmood, DT; Pennington, JS. Stage of development descriptions for soybeans, Glycine Max (L.) Merrill 1. **Crop science**, v. 11, n. 6, p. 929-931, 1971.

Hirakuri, MH. Efeito da estiagem na viabilidade econômica da produção de soja no Oeste do Paraná: um estudo de caso da safra 2008/2009. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 40, n. 2, p. 230-237, 2010.

IGC. **International Grains Council**. Grain market, Report No. 483, 24 November, 2017. <https://www.igc.int/downloads/gmrsummary/gmrsumme.pdf>

Krausz, RF; Young, BG. Response of glyphosate resistant soybean (Glycine max) to trimethylsulfonium and isopropylamine salts of Glyphosate. **Weed Technol.**, v. 15, n. 4, p. 745-749, 2001.

Matzenauer, R. et al. Análise agroclimática das disponibilidades hídricas para a cultura da soja na região do Planalto Médio do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v.6, n.2, p.263-275, 1998.

Neumaier, N; Bonatto, ER. **Estresses em soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, cap.1, p.19-44, 2000.

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

Oya, T. et al. Drought tolerance characteristics of Brazilian soybean cultivars: evaluation and characterization of drought tolerance of various Brazilian soybean cultivars in the field. **Plant Production Science**, Tokyo, v.7, p.129 – 137, 2004.

Papineni, S; Murray, JA; Ricardo, E; Dunville, CM; Sura, RK, Thomas, J. Evaluation of the safety of a genetically modified DAS-44406-6 soybean meal and hulls in a 90-day dietary toxicity study in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, n. 1, p. 245-252, 2017.

Parker, RG. et al. Comparison of glyphosate products in glyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum*) and corn (*Zea mays*). **Weed Technol.**, v. 19, n. 4, p. 796-802, 2005.

Rincker, K; Nelson, R; Specht, J; Sleper, D; Cary, T; Cianzio, SR; Casteel, S; Conley, S; Chen, P; Davis, V. Genetic improvements of U.S. soybean in maturity groups II, III, and IV. **Crop Science**, v. 54, n. 4, p. 1419–1432, 2014.

Sinclair, TR. Soybean yields and soil water status in Argentina: Simulation analysis. **Agricultural Systems**, London, v.94, p. 471 – 477, 2007.

Soltani, N; Dille, JA; Burke, IC; Everman, WJ; Vangessel, MJ; Davis, VM; Sikkema, PH. Perspectives on Potential Soybean Yield Losses from Weeds in North America. **Weed Technology**, v. 31, n. 1, p. 148-154, 2017.

Song, J; Kim, J; Im, J; Lee, K; Lee, B; Kim, D. The Effects of Single- and Multiple-Weed Interference on Soybean Yield in the Far-Eastern Region of Russia. **Weed Science**, v. 65, n. 3, p. 371-380, 2017.

Specht, JE; Diers, BW; Nelson, RL; Francisco, J; Toledo, F; Torrión, JA; Grassini, P. Yield gains in major US field crops. **American Society of Agronomy**. v. 33. p. 311-356, 2014.

USDA. United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. **World Agricultural Production**. 2018. (Circular Series, November, 2017). Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2019.

### **CAPÍTULO 3 - RESISTÊNCIA A HERBICIDAS NA SOJA ENLIST E3™: UMA ABORDAGEM ENVOLVENDO RESPOSTAS ANTIOXIDANTES**

**RESUMO** – Os herbicidas são aplicados em lavouras com o objetivo de eliminar plantas invasoras que estejam causando prejuízo à cultura, embora os efeitos sobre estas culturas muitas vezes não são perceptíveis ou não são amplamente considerados, levando a indução do estresse oxidativo. O objetivo do presente trabalho foi avaliar as respostas bioquímicas da soja Enlist E3™ relacionadas à sua resistência a herbicidas, através da caracterização das respostas antioxidantes. O experimento foi conduzido usando um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 4 com quatro repetições, em ambiente controlado. Os tratamentos foram formados pela combinação de doses comerciais dos herbicidas 2,4-D sal colina (780 g e.a. ha<sup>-1</sup>), glyphosate (820 g e.a. ha<sup>-1</sup>) e 2,4-D sal colina+glyphosate (1600 g e.a. ha<sup>-1</sup>), avaliados em quatro tempos (12, 24, 48 and 120 horas após a aplicação (HAA)). Os resultados indicaram que apenas as plantas com aplicação de 2,4-D exibiram redução no diâmetro do caule. Por outro lado, plantas com aplicações dos herbicidas 2,4-D, glyphosate e glyphosate+2,4-D exibiram aumento na atividade das enzimas SOD, CAT, APX e GST, com concomitante redução nas conteúdos de MDA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os resultados demonstram que a atividade de enzimas antioxidantes estão relacionadas a resistência a herbicidas, atribuída a soja Enlist E3™.

**Palavras-chave:** *Glycine max*, estresse oxidativo, controle químico.

### **CHAPTER 3 - RESISTANCE TO HERBICIDES IN ENLIST E3™ SOYBEAN: AN APPROACH INVOLVING ANTIOXIDANT RESPONSES**

**ABSTRACT** - Herbicides are applied in crops with the aim of eliminating invasive plants that are causing damage to the crop, but these effects are not

often perceptible or not widely considered, leading to the induction of oxidative stress. Thus, the main of this work was to evaluate the biochemical responses of Enlist E3™ related to its resistance to herbicides supported by a biochemical approach involving antioxidant responses. The experiment was carried out using a completely randomized design, in a 4 x 4 factorial, with four replicates, developed in a controlled environment. The treatments were formed by the combination of commercial herbicide dose of 2,4-D salt choline (780 g and / ha<sup>-1</sup>), glyphosate (820 g ea / ha<sup>-1</sup>) and 2,4-D salt choline + glyphosate (1600 g ea / ha<sup>-1</sup>), and four different periods (12, 24, 48 and 120 hours after application (HAA)). Overall results indicated that only plants with 2,4-D application exhibited decrease in stem diameter. On the other hand, plants with 2,4-D, glyphosate and glyphosate + 2,4-D applications exhibited increased SOD, CAT, APX and GST activities, with concomitant decreased MDA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contents. Thus, our findings demonstrate that the activity of ROS- scavenging enzymes can be related to herbicide resistance, attributed to Enlist E3™ soybean.

**Keywords:** *Glycine max*, oxidative stress, chemical control

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, com 32% do total produzido, sendo considerado o maior exportador do produto, com cerca de 64,7 milhões de toneladas, tendo a China como principal importador da soja brasileira (USDA, 2019).

O United States Department of Agriculture (USDA) estima que as áreas plantadas no Brasil devam ter uma expansão de quase 7% passando de 35,10 milhões de hectares na safra 2017/2018 para 37,50 milhões de toneladas na safra 2018/19. Já a produtividade, calculada pela média dos cinco anos, será de 3.210 kg/ha para safra 2018/2019, enquanto na safra 2017/18, este valor era de 3.410 kg/ha. (CONAB, 2019). Esta redução pode estar relacionada a alguns fatores ambientais, como os estresses hídrico, térmico, seleção de cultivares e o manejo adotado pelos produtores para o controle de pragas, doenças e plantas daninhas.

Segundo Song et al. (2017), o principal motivo do baixo rendimento da soja está relacionado a problemas ocasionados pelo manejo inadequado das plantas daninhas. Essas plantas competem com a cultura por luz, água e nutrientes, e podem reduzir drasticamente a qualidade e o rendimento da soja (Soltani et al, 2017).

Em condições normais, as espécies reativas de oxigênio (ERO) são geradas pelo metabolismo dos organismos aeróbicos, principalmente através da fotossíntese e respiração, porém mantidos em níveis basais através de sistemas antioxidantes de defesa (Gratão et al., 2005). A produção das ERO pode ser intensificada devido a exposição das plantas à estresses abióticos como temperaturas extremas (Gaveliene et al., 2013), metais pesados (Gratão et al., 2012), déficit hídrico (Jeyaramraja & Thushara, 2013), altas concentrações salinas (Ellouzi et al., 2013), aplicação de herbicidas (Zabalza et al., 2007; Zobiole et al., 2010), entre outros.

A partir do estresse oxidativo pode ocorrer a morte celular programada devido à peroxidação lipídica de membranas, oxidação de proteínas, inibição enzimática e danos ao DNA e RNA. A peroxidação lipídica é um processo fisiológico que ocorre em todas as células aeróbicas sendo iniciada pela extração ou adição de um radical hidrogênio. A peroxidação é um dos principais mecanismos moleculares envolvidos no dano oxidativo a estruturas celulares (Repetto et al., 2012).

A nova cultivar, denominada de Enlist E3™, foi desenvolvida com transformação mediada por *Agrobacterium* para incorporar de forma estável o gene AAD-12 de *Delftia acidovorans*, os 2mEPSPS de *Zea mays* e o gene PAT de *Streptomyces viridochromogenes*, em soja, visando a resistência aos herbicidas 2,4-D, glyphosate e glufosinato de amônio, respectivamente (Papineni et al., 2017; Fast et al., 2016). O gene AAD-12 que codifica a enzima ariloxalcanoato dioxigenase-12 (AAD-12), quando expressa nas plantas, degrada o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em 2,4-diclorofenol (DCP; herbicida inativo), promovendo, assim, a resistência ao 2,4-D. O gene 2mEPSPS, codifica uma dupla proteína de 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintase de milho mutante (Papineni et al., 2017). Essa proteína, quando codificada é insensível ao glyphosate, proporcionando assim, resistência ao

glyphosate em plantas que expressam a proteína 2mEPSPS. Além destes, essa cultivar também é composta pelo gene PAT, que expressa a fosfinotricina acetil transferase e promove a resistência aos herbicidas de glufosinato de amônio.

A resposta antioxidante varia de acordo com o modo de ação do herbicida aplicado e da forma de cultivo. O estudo da resposta antioxidante pode dar importante informação sobre a resistência de uma planta à aplicação de um herbicida. Tais informações poderiam ser decisivas na hora de avaliar a produtividade do cultivo e o dano ao meio ambiente através das doses que são necessárias para ativar esses mecanismos de resposta (Ekmekci; Terzioglu, 2005).

As defesas contra ERO são ativadas, envolvendo mecanismos antioxidantes enzimáticos que operam juntos em um eficiente sistema de desintoxicação (Gratão et al., 2005). No entanto, há uma grande carência de informações sobre os mecanismos bioquímicos desencadeados pela soja Enlist E3™ quando submetida a aplicação de herbicidas.

Apesar da soja Enlist E3™ apresentar três genes (*AAD-12*, *2mEPSPS* e *PAT*) relativos a resistência à herbicidas, esta cultivar tem apresentado sintomas de intoxicação causada pela aplicação de diferentes herbicidas. Diante disso, o presente trabalho teve o objetivo de verificar se esta cultivar apresenta respostas bioquímicas relacionadas à sua resistência, através da caracterização da resposta antioxidante.

#### **4. CONCLUSÃO**

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que os sistemas antioxidantes avaliados neste trabalho estão relacionados com a resistência à herbicidas atribuída a soja Enlist E3™, comprovado pela atividade das enzimas SOD, APX, GST e CAT.

#### **5. REFERÊNCIAS**

AHSAN, N; LEE, DG; LEE, KW; ALAM, I; LEE, SH; BAHK, JD; LEE, BH. Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic

approach. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 1062-1070, 2008.

Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environmental** 24:1337-1344, 2001.

Alves, LR, Monteiro, CC, Carvalho, RF, Ribeiro, PC, Tezotto, T, Azevedo, RA, Gratão, PL. Cadmium stress related to root-to-shoot communication depends on ethylene and auxin in tomato plants. *Environ. Exp. Bot.* 134, 102–115, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.11.008>.

Boaretto LF, Carvalho G, Borgo L, Creste S, Landell MGA, Mazzafera P, Azevedo RA. Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry** 74:165-75, 2014.

Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 71:248-254, 1976.

Cataneo, AC. Atividade de superóxido dismutase em plantas de soja (*Glycine max*L.) cultivadas sob estresse oxidativo causado por herbicida. **Revista Brasileira de Herbicidas**, 4(2), 23-31, 2010.

Chen, L; Song, Y; Li, S; Zhang, L; Zou, C; Yu, D. The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdã, v. 1819, n. 2, p. 120–128, 2012.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Grãos. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. 2019. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em: 15/03/2019.

Correa-Aragunde, N; Foresi, N; Delledonne, M; Lamattina, L. Auxin induces redox regulation of ascorbate peroxidase activity by S-nitrosylation/denitrosylation balance resulting in changes of root growth pattern in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 11, p. 3339-3349, 2013.

Dat J, Vandenberghe S, Vranová E, Montagu MV, Inzé D, Breusegem FV Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 57:779-795, 2000.

Ekmekci, Y; Terzioglu, S. Effects of oxidative stress induced by paraquat on wild and cultivated wheats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 83, n. 2. p. 69-81, Oct. 2005.

Ellouzi, H; Benhamed. K; Jana, C; Munné-bosch, S; Abdelly, C. Early effects of salt stress on the physiological and oxidative status of *Cakile maritima* (halophyte) and *Arabidopsis thaliana* (glycophyte) seedlings. **Plant Physiology**, 16, 128–143, 2011.

Fast, BJ; Galan, MP; Schafer, AC. Event DAS-444Ø6-6 soybean grown in Brazil is compositionally equivalent to non-transgenic soybean. *GM Crops & Food*, v. 7, n. 2, p. 79–83, 2016. <https://doi.org/10.1080/21645698.2016.1184815>

Ferreira DF. Sisvar: a computer statistic alanalysis system. **Ciência e Agrotecnologia** 35:1039-1042, 2011.

Ferreira, LC; Cataneo, AC; Remaeh, LMR; Corniani, N; Fátima FT; Souza, YA; Scarvrioni, J; Soares, BJA. Nitric oxide reduces oxidative stress generated by lactofen in soybean plants **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 97(1), 47-54, 2010.

Fuerst EP. Partial characterization of glutathione-S-transferase is ozymes induced by the herbicides afener benoxacor in maize. **Plant Physiol.** Bethesda, v.102, p.795- 802, 1993.

Gaveliene, V; Novickiene, L; Kyte, LP. Effect of auxin physiological analogues on rapeseed (*Brassica napus*) cold hardening, seed yield and quality. **Journal of Plant Research**, 126(2), 283–292, 2013.

Gratão PL, Monteiro CC, Carvalho RF, Tezotto T, Piotto FA, Peres LEP, Azevedo RA. Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd stress ful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry** 56:79-96, 2012.

Gratão, PL; Monteiro, CC; Tezotto, T; Carvalho, RF; Alves, LR; Peters, LP; Azevedo, RA. Cadmium stress antioxidant responses and root-to-shoot communication in grafted tomato plants. **Biomaterials**, London, v. 28, n. 5, p. 803-816, 2015.

Gratão, PL; Polle, A; Lea, PJ; Azevedo, RA. Making the life of heavy metal stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 32, n. 6, p. 481-494, 2005.

Irzyk, GP; Fuerst, EP. Purification and characterization of a glutathione S-transferase from benoxacor – treated maize (Zeamays). **Plant Physiol.**, Bethesda, v.102, p.803-810, 1993.

Jablonkai, I; Hatzios, KK. Role of glutathione S-transferase in the selectivity of acetochlor in maize and wheat. **Pestic. Biochem. Physiol.**, San Diego, v. 41, p. 221-231, 1991.

Jakob, WB. Glutathione transferases: an overview. **Methods in Enzymology** v.113, p. 495-499 1985.

Jepson, I. Cloning and characterization of maize herbicide-induced cDNA encoding subunits of glutathione S-transferase isoforms I, II and IV. **Plant Mol. Biol.**, Dordrecht, v. 26, p. 1855-1866, 1994.

Jeyaramraja, PR; Thushara, SS. Sequence of physiological responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) subjected to soil moisture deficit. **Photosynthetica**, 51(3), 395-403, 2013.

Levine, A. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst states the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v. 79, p. 583-93, 1994.

Mhamdi, A; Queval, G; Chaouch, S; Vanderauwera, S; Van Breusegem, F; Noctor, G. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, 61, 4197-4220, 2010.

Papineni, S; Murray, JA; Ricardo, E; Dunville, CM; Sura, RK; Thomas, J. Evaluation of the safety of a genetically modified DAS-44406-6 soybean meal and hulls in a 90-day dietary toxicity study in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, n. 1, p. 245-252, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.048>

Repetto, M; Semprine, J; Boveris, A. **Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination**. In: Catala, A (ed). Lipid peroxidation. In Tech, Rijeka, 3-30, 2012.

Roy, PR; Ul-Arif, MT; Akter T; Ray, SR; Sayed, MA. Exogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide alleviate salt-induced oxidative stress in rice (*Oryza sativa* L.) by enhancing antioxidant enzyme activities and proline content. **Advances in Environmental Biology** 10:148-154, 2016.

Sharma, P; Jha, AB; Dubey, RS; Pessarakli, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, London, v. 2012, p. 1-26, 2012.

Shimabukuro, RH. Glutathione conjugation: atrazine detoxification mechanism in corn. **Plant Physiol.**, Bethesda, v. 46, p.103-107, 1970.

Shimizu, N; Hosogi, Park, PJ. Reactive oxygen species (ROS) generation and ROS-induced lipid peroxidation are associated with plasma membrane modifications in host cells in response to AK-toxin I from *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. **Journal of Genetic Plant Pathology** 72:6-15, 2006.

Soltani, N; Dille, JA; Burke, IC; Everman, WJ; Vangessel, MJ; Davis, VM; Sikkema, PH. Perspectives on Potential Soybean Yield Losses from Weeds in North America. **Weed Technology**, v. 31, n. 1, p. 148-154, 2017. <https://doi.org/10.1017/wet.2016.2>

Sommer, A; Boger, P. Characterization of recombinant corn glutathione S-transferase isoforms I, II, III, and IV. **Pestic. Biochem. Physiol.**, San Diego, v. 63, p.127-138, 1999.

Song, J; Kim, J; Im, J; Lee, K; Lee, B; Kim, D. The Effects of Single- and Multiple-Weed Interference on Soybean Yield in the Far-Eastern Region of Russia. **Weed Science**, v. 65, n. 3, p. 371-380, 2017.

Timmerman, KP. Molecular characterization of corn glutathione S-transferase isozymes involved in herbicide detoxification. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v. 77, p. 465- 471, 1989.

USDA. **United States Department of Agriculture**. Foreign Agricultural Service. World Agricultural Production.2019. (Circular Series, janeiro, 2019). Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>. Acesso: 20/03/2019.

Wang, W; Lu, J; Ren, T; Li, X; Su, W; Lu, M. Evaluating regional mean optimal nitrogen rates in combination with indigenous nitrogen supply for rice production. **Field Crops Research**, 137, 37-48, 2012.

Zabalza, A; Gaston, S; Sandalio, LM; Rio, LA; Royuela, M. Oxidative stress is not related to the mode of action of herbicides that inhibit acetolactate synthase. **Environmental and Experimental Botany**, 59(2),150–159, 2007.

Zhang, JJ; Lu, YC; Zhang, JJ; Tan, LR; Yang, H. Accumulation and toxicological response of atrazine in rice crop. **Ecotoxicology and environmental safety**, 102(1), 105-112, 2014.

Zobiolo, LHS; Oliveira, JRRS; Kremer, RJ; Constantin, J; Bonato, CM; Muniz, AS. Water use efficiency and photosynthesis of glyphosate resistant soybean as affected by glyphosate. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 97(3), 182–193, 2010.