

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 13/07/2020.

**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^a. Dra. Priscila Lupino Gratão

Coorientador: Prof^o. 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 Agrônômica 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^a. Dr^a. Priscila Lupino Gratão, pelas orientações, disponibilidade, dedicação, amizade, paciência, e principalmente pelos conselhos. Prof^a. Priscila, muito obrigado por confiar em mim! Sem o seu apoio, nada disso seria possível.

Ao meu coorientador Prof^o. 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™ A APLICAÇÃO DE HERBICIDAS.....	22
1. INTRODUÇÃO	24
2. MATERIAL E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	Erro! Indicador não definido.
4. CONCLUSÃO.....	25
5. REFERÊNCIAS.....	26
CAPÍTULO 3 - RESISTÊNCIA A HERBICIDAS NA SOJA ENLIST E3™: UMA ABORDAGEM ENVOLVENDO RESPOSTAS ANTIOXIDANTES.....	29
1. INTRODUÇÃO	30
2. MATERIAL E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
2.1. Análises de crescimento.....	Erro! Indicador não definido.
2.2. Análises bioquímicas.....	Erro! Indicador não definido.
2.2.1. Peroxidação lipídica	Erro! Indicador não definido.

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

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-44406-6 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 analysis system. ***Ciência e Agrotecnologia*** 35:1039-1042, 2011.

Ferreira, LC; Cataneo, AC; Remaeh, LMR; Corniani, N; Fátima FT; Souza, YA; Scarvioni, 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 isozymes 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. H₂O₂ 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.