

FÁBIO HENRIQUE KRENCHINSKI

**EFEITOS DO GLYPHOSATE NA EXPRESSÃO DE GENES, TEOR DE LIGNINA,
FÓSFORO E RENDIMENTO DE GRÃOS DE SOJA COM E SEM O GENE *CP4-
EPSPS***

Botucatu

2022

FÁBIO HENRIQUE KRENCHINSKI

**EFEITOS DO GLYPHOSATE NA EXPRESSÃO DE GENES, TEOR DE LIGNINA,
FÓSFORO E RENDIMENTO DE GRÃOS DE SOJA COM E SEM O GENE *CP4-
EPSPS***

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

Orientador: Prof. Dr. Caio Antonio
Carbonari

Botucatu

2022

K92e Krenchinski, Fábio Henrique
Efeitos de glyphosate na expressão de genes, teor de lignina, fósforo e rendimento de grãos de soja com e sem o gene cp4-epsps / Fábio Henrique Krenchinski. -- Botucatu, 2022
157 p. : il., tabs.

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

1. Agronomia. 2. Soja. 3. Hormese. 4. Glifosato. 5. Plantas efeito de glifosato. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFEITOS DO GLYPHOSATE NA EXPRESSÃO DE GENES, TEOR DE LIGNINA, FÓSFORO E RENDIMENTO DE GRÃOS DE SOJA COM E SEM O GENE CP4-EPSPS

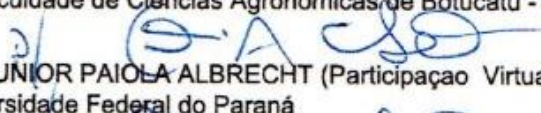
AUTOR: FÁBIO HENRIQUE KRENCHINSKI

ORIENTADOR: CAIO ANTONIO CARBONARI

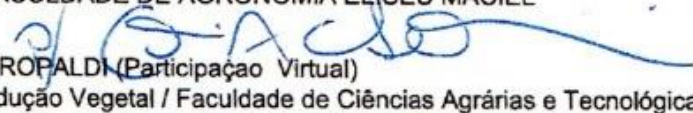
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. CAIO ANTONIO CARBONARI (Participação Virtual)
FCAUNESP / BotucatuSP


Prof. Dr. EDIVALDO DOMINGUES VELINI (Participação Virtual)
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP


Prof. Dr. ALFREDO JUNIOR PAOLA ALBRECHT (Participação Virtual)
Setor Palotina / Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. LUIS ANTONIO DE AVILA (Participação Virtual)
FITOSSANIDADE / FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL


Prof. Dr. LEANDRO TROPALDI (Participação Virtual)
Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - UNESP

Botucatu, 10 de junho de 2022

A minha esposa Fernanda,
Aos meus pais Benjamin e Tânia,
Aos meus irmãos Leandro e Kelli,
Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço imensamente a Deus, pelas grandes bênçãos, pelas pessoas que tenho encontrado em meu caminho, pela força, determinação, coragem, satisfação e paz que me proporciona todos os dias em minha vida.

A minha esposa Fernanda, pelo carinho, amor e paciência durante esse período.

Aos meus pais Benjamin e Tânia, por todo apoio e por fazerem parte desta grande conquista.

Aos meus irmãos Kelli e Leandro, e meus cunhados Alisson e Vanessa e minhas sobrinhas Maria Júlia, Helena e Beatriz por todos os momentos de alegria e carinho.

Aos Professores Caio Antonio Carbonari e Edivaldo Domingues Velini, pela confiança depositada em mim, pela orientação, ensinamentos, paciência, amizade e pelo exemplo de profissionalismo e dedicação em gerar conhecimento na área das plantas daninhas.

Aos professores Alfredo Junior Paiola Albrecht e Leandro Paiola Albrecht, pela amizade, estímulo, ensinamentos e pela iniciação na ciência das plantas daninhas e agronomia.

Ao professor Ivan de Godoy Maia e a doutoranda Mariana, pelo auxílio na parte de genética. Ao Laboratório de Bromatologia, em especial ao Prof. Paulo Meirelles e a técnica Gisele Setznagl, pelo auxílio prestado durante a pesquisa. Ao Dr. Geysson Javier Fernandez Garcia que realizou a parte de bioinformática relacionado a tese.

Aos meus amigos e colegas, especialmente ao Bruno, Danilo, Natalia, Renato, Victor e Vinicius pelo auxílio nas atividades, trabalho em equipe e pelas horas de lazer juntos.

Aos técnicos Guilherme, Marcelo e Roberto pelo auxílio nas atividades, ensinamentos e companheirismo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São (FAPESP – Processo: 2018/13719-7), pela bolsa de Doutorado concedida.

Ao CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudos concedida.

Ao grupo Supra pesquisa, pela grande ajuda nos experimentos a campo realizados no Paraná.

Ao departamento de Agricultura da FCA – UNESP e ao programa de Pós-Graduação em Agricultura.

À equipe da Fazenda Lageado, FCA – UNESP, que me auxiliou com insumos agrícolas e nas atividades de campo para aquisição de resultados de alta qualidade. Enfim, a todos que de uma ou de outra forma estiveram presentes me ajudando a construir essa grande conquista.

Muito obrigado!

RESUMO

Os objetivos do presente trabalho foram entender os efeitos no teor de lignina, fósforo, componentes da rota do ácido chiquímico, parâmetros de crescimento e produtividade bem como por meio de RNASeq entender quais os genes e vias enriquecidas pela aplicação de subdoses de glyphosate em soja NR, RR e RR2. Além disso foi avaliada a forma de aplicação de subdoses em tratamento de sementes. Para isso foram realizados cinco experimentos em casa de vegetação em duplicata e quatro experimentos de campo em diferentes locais de cultivo. Na aplicação foliar de glyphosate no cultivar NR o intervalo de doses de 5,6-45 g e.a ha⁻¹, já na RR o intervalo de 45-720 g e.a ha⁻¹ e RR2 o intervalo de doses 11,25-180 g e.a ha⁻¹, proporcionaram incremento de acúmulo de biomassa de 12-28% em relação a testemunha. No tratamento de sementes para a cultivar NR o intervalo de doses de 45-180 g e.a ha⁻¹, na cultivar RR as doses de 90-360 g e.a ha⁻¹ e para a cultivar RR2 o intervalo de 90-180 g e.a ha⁻¹, proporcionaram incremento de acúmulo de biomassa de 16-60% em relação a testemunha. As doses de 90 e 180 g e.a ha⁻¹ de glyphosate no tratamento de sementes, proporcionou maior crescimento e acúmulo de biomassa para as cultivares de soja RR e RR2. Foram identificados 587 DEG presentes em diversas vias enriquecidas. Foram observadas vias de catabolismo de lignina, resultando em redução dos seus teores após a aplicação de glyphosate. As cultivares de soja apresentaram maior concentração de fósforo quando foram aplicadas com as subdoses de glyphosate, embora não tenha sido observada vias e genes relacionados a esse processo. Os componentes da rota do ácido chiquímico foram afetados com a aplicação de glyphosate, e parecem estar ligados a diversas vias enriquecidas. A aplicação de subdoses de glyphosate incrementou o teor de fósforo, de aminoácidos, ácido salicílico, o crescimento e acúmulo de biomassa das plantas de soja RR e RR2, além de reduzir os teores de lignina. A aplicação de AIP demonstrou que a redução de lignina não é o único responsável pelo incremento de biomassa nas plantas de soja RR e RR2. Em relação a produtividade de grãos, de modo geral, ocorreram incrementos de produtividade em torno de 4 a 38%, variando conforme local e variedades de soja estudadas, principalmente para o glyphosate aplicado no tratamento de sementes e aplicação foliar + tratamento de sementes em relação a testemunha. A aplicação de subdoses de glyphosate pode ser realizado no tratamento de sementes

de soja. Os teores de fósforo, lignina e dos componentes da rota do ácido chiquímico, bem como as vias enriquecidas encontradas por RNAseq estão envolvidos com o estímulo de subdoses de glyphosate em cultivares de soja NR, RR e RR2. Assim a somatória desses fatores é responsável pelo efeito de estímulo em soja.

Palavras-chave: rnaseq; subdoses; rota do ácido chiquímico; produtividade da soja.

ABSTRACT

The objectives of the present work were to understand the effects on the content of lignin, phosphorus, components of the shikimic acid pathway, growth parameters and productivity, as well as through RNASeq to understand which genes and pathways are enriched by the application of subdoses of glyphosate in NR soybean, RR and RR2. In addition, the form of application of sub-doses in seed treatment was evaluated. For this, five experiments were carried out in a greenhouse in duplicate and four field experiments were carried out in different cultivation sites. In the foliar application of glyphosate in the NR cultivar, the dose range of 5.6-45 g a.e ha⁻¹, in the RR the range of 45-720 g a.e ha⁻¹ and RR2 the dose range of 11.25-180 g a.e ha⁻¹, provided an increase in biomass accumulation of 12-28% in relation to the control. In the seed treatment for cultivar NR the dose range of 45-180 g a.e ha⁻¹, for cultivar RR the doses of 90-360 g a.e ha⁻¹ and for cultivar RR2 the range of 90-180 g a.e ha⁻¹, provided an increase in biomass accumulation of 16-60% in relation to the control. The doses of 90 and 180 g a.e ha⁻¹ of glyphosate in the seed treatment provided greater growth and biomass accumulation for soybean cultivars RR and RR2. We identified 587 DEG present in several enriched pathways. Lignin catabolism pathways were observed, resulting in a reduction of its contents after glyphosate application. Soybean cultivars showed higher phosphorus concentration when applied with sub doses of glyphosate, although no pathways and genes related to this process were observed. Components of the shikimic acid pathway were affected with the application of glyphosate, and appear to be linked to several enriched pathways. The application of sub-doses of glyphosate increased the content of phosphorus, amino acids, salicylic acid, growth and biomass accumulation of RR and RR2 soybean plants, in addition to reducing lignin levels. The application of AIP showed that the reduction of lignin is not the only responsible for the increase in biomass in RR and RR2 soybean plants. Regarding grain yield, in general, there were yield increases of around 4 to 38%, varying according to location and soybean varieties studied, mainly for glyphosate applied in seed treatment and foliar application + seed treatment in relation to the witness. The application of sub-doses of glyphosate can be performed in the treatment of soybean seeds. Phosphorus, lignin and shikimic acid pathway components, as well as the enriched pathways found by RNAseq, are involved in stimulating glyphosate

underdoses in NR, RR and RR2 soybean cultivars. Thus, the sum of these factors is responsible for the stimulus effect in soybean.

Keywords: rnaseq; low doses; shikimic acid pathway; soybean yield.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	17
CAPÍTULO 1 - SUBDOSES DE GLYPHOSATE EM SOJA COM APLICAÇÃO FOLIAR E NO TRATAMENTO DE SEMENTES ¹	19
1.1 INTRODUÇÃO	20
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
1.2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS EXPERIMENTOS	22
1.2.2 EXPERIMENTO 1. SUBDOSES DE GLYPHOSATE EM SOJA NR, RR E RR2 COM A APLICAÇÃO VIA FOLIAR E TRATAMENTO DE SEMENTES.	23
1.2.3 EXPERIMENTO 2. CRESCIMENTO INICIAL DE CULTIVARES DE SOJA RR E RR2 COM APLICAÇÃO DE SUBDOSES DE GLYPHOSATE NO TRATAMENTO DE SEMENTES.....	24
1.2.4 ANÁLISE DOS DADOS.....	24
1.3 RESULTADOS.....	25
1.3.1 SUBDOSES DE GLYPHOSATE EM SOJA NR, RR E RR2 COM A APLICAÇÃO FOLIAR...25	
1.3.2 SUBDOSES DE GLYPHOSATE EM SOJA NR, RR E RR2 COM A APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE SEMENTES.....	31
1.3.3 CRESCIMENTO INICIAL DE CULTIVARES DE SOJA RR E RR2 COM APLICAÇÃO DE SUBDOSES DE GLYPHOSATE NO TRATAMENTO DE SEMENTES.....	34
1.4 DISCUSSÃO	37
1.4.1 SUBDOSES DE GLYPHOSATE EM SOJA NR, RR E RR2 COM A APLICAÇÃO FOLIAR...37	
1.4.2 SUBDOSES DE GLYPHOSATE EM SOJA NR, RR E RR2 COM A APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE SEMENTES.....	39
1.4.3 CRESCIMENTO INICIAL DE CULTIVARES DE SOJA RR E RR2 COM APLICAÇÃO DE SUBDOSES DE GLYPHOSATE NO TRATAMENTO DE SEMENTES.....	40
1.5 CONCLUSÕES	41
1.6 REFERÊNCIAS.....	41
CAPÍTULO 2 - TRANSCRIPTOMAS, EXPRESSÃO DE GENES E SUA RELAÇÃO COM OS TEORES DE LIGNINA, FÓSFORO, ETR E COMPONENTES DA ROTA DO ÁCIDO CHIQUIMICO EM PLANTAS DE SOJA APÓS A APLICAÇÃO DE GLYPHOSATE.....	46
2.1 INTRODUÇÃO	47
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	49

2.2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS EXPERIMENTOS	49
2.2.2	VARIÁVEIS ANALISADAS.....	50
2.2.2.1	ANÁLISE DE TRANSCRIPTOMAS	51
2.2.2.2	ETR	52
2.2.2.3	TEOR DE LIGNINA	52
2.2.2.4	TEOR DE FÓSFORO.....	53
2.2.2.5	TEOR DOS COMPONENTES DA ROTA DO ÁCIDO CHIQUÍMICO	53
2.2.2.6	MASSA DA MATÉRIA SECA.....	54
2.3	RESULTADOS	55
2.4	DISCUSSÃO	64
2.5	CONCLUSÕES	67
2.6	REFERÊNCIAS	68
	CAPÍTULO 3 - TEORES DE LIGNINA, FÓSFORO E COMPORTAMENTO DE CULTIVARES DE SOJA RR E RR2 APÓS A APLICAÇÃO DE GLYPHOSATE E 2-AMINOINDANO-2-FOSFÔNICO.....	73
3.1	INTRODUÇÃO	74
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	76
3.2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS EXPERIMENTOS.....	76
3.2.2	EXPERIMENTO 1. PRODUÇÃO DE BIOMASSA, TEORES DE LIGNINA E FENILALANINA EM SOJA RR E RR2 APÓS APLICAÇÃO DE GLYPHOSATE E ÁCIDO 2-AMINOINDANO-2- FOSFÔNICO.....	77
3.2.3	EXPERIMENTO 2. SUBDOSES DE GLYPHOSATE EM SOJA RR E RR2 COM APLICAÇÃO FOLIAR.....	77
3.2.4	VARIÁVEIS ANALISADAS.....	78
3.2.4	ANÁLISE DOS DADOS.....	79
3.3	RESULTADOS	79
3.3.1	PRODUÇÃO DE BIOMASSA, TEORES DE LIGNINA E FENILALANINA EM SOJA RR E RR2 APÓS APLICAÇÃO DE GLYPHOSATE E ÁCIDO 2-AMINOINDANO-2-FOSFÔNICO.....	80
3.3.2	SUBDOSES DE GLYPHOSATE EM SOJA RR E RR2 COM APLICAÇÃO FOLIAR	83
3.4	DISCUSSÃO	95
3.4.1	PRODUÇÃO DE BIOMASSA, TEORES DE LIGNINA E FENILALANINA EM SOJA RR E RR2 APÓS APLICAÇÃO DE GLYPHOSATE E ÁCIDO 2-AMINOINDANO-2-FOSFÔNICO.....	95
3.4.2	SUBDOSES DE GLYPHOSATE EM SOJA RR E RR2 COM APLICAÇÃO FOLIAR	97
3.5	CONCLUSÕES	100

	CAPÍTULO 4 - CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E RENDIMENTO DE GRÃOS NA SOJA RR E RR2, COM DIFERENTES FORMAS DE APLICAÇÃO DE SUBDOSE DE GLYPHOSATE ¹	107
4.1	INTRODUÇÃO	108
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	110
4.3	RESULTADOS.....	114
4.4	DISCUSSÃO	139
4.5	CONCLUSÕES	143
4.6	REFERÊNCIAS.....	143
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	148
	REFERÊNCIAS.....	149
	APÊNDICES	150

INTRODUÇÃO GERAL

A soja apresenta-se como a cultura de maior importância no cenário atual da agricultura brasileira. Destaca-se a alta exportação dos grãos e derivados, além da utilização do óleo e farelo para alimentação humana e animal. No Brasil são cultivados aproximadamente 40 milhões de hectares, com produtividade média 58 sacas (60 kg) por hectare (CONAB, 2022), porém essa média de produtividade é bem abaixo do que tem sido observados em concursos de soja cultivados para altas produtividades, que podem produzir até 123 sacas de soja por hectare (CESB, 2021). Os desafios encontrados para o aumento de produção de soja, sem derrubada de matas nativas, resultarão em pesquisas de técnicas e tecnologias que deverão aumentar a produtividade por área cultivada, viabilizando aquelas que resultaram em baixo custo.

O herbicida glyphosate tem sido utilizado em grandes quantidades nos sistemas de cultivos de soja brasileira e mundial, devido principalmente ao desenvolvimento de cultivares geneticamente modificadas resistentes a esse herbicida, bem como a alta adoção dessa tecnologia por parte dos produtores. O glyphosate é um herbicida considerado não seletivo, que pertence ao grupo químico das glicinas substituídas, atua na rota do ácido chiquímico, inibindo a enzima EPSPs. Considerado altamente solúvel em água (15700 mg L^{-1}) e coeficiente de partição octanol/água muito baixo ($Kow=0.00033$), por isso apresenta baixa mobilidade no solo (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011). É registrado no Brasil com diversas marcas comerciais, sais e concentrações. Seus sintomas aparecem com redução de crescimento, clorose e posterior necrose e morte das plantas sensíveis.

Um dos efeitos do glyphosate que vem sendo estudado é o subdoses desse herbicida proporcionando incremento em desenvolvimento e acúmulo de biomassa em diversas espécies de plantas cultivadas e plantas daninhas (BRITO et al., 2018). Esse efeito é descrito como hormesis. Apesar de não ser totalmente conhecido o efeito pelo qual o glyphosate em pequenas doses favorece o desenvolvimento das plantas, existem algumas hipóteses da sua ocorrência. A primeira refere-se a planta responder a um pequeno estresse, provocando respostas positivas em vários processos. Outra hipótese diz respeito a redução dos teores de lignina que está diretamente envolvida na rota de ação do glyphosate. Com isso os teores de lignina podem reduzir destinando fotoassimilados para outras partes da planta. Como o glyphosate se beneficia dos transportadores de fosfato para se movimentar dentro da planta, ele

pode desencadear a expressão de genes de transportadores específicos de fósforo aumentando sua absorção e essa é outra hipótese encontrada. Porém a ocorrência do efeito de hormesis está atrelado também a uma série de processos dentro da planta que devem ser estudados e conhecidos. O uso de ferramentas de sequenciamento genético pode proporcionar conhecer todos os processos em que a hormesis de glyphosate promove efeito nas plantas de soja.

Uma vez que o efeito de hormesis de glyphosate pode ocorrer em plantas daninhas que convivem com a soja, a aplicação foliar poderia beneficiar também as plantas daninhas além da cultura. Assim alternativas de aplicação de glyphosate no tratamento de sementes devem ser estudadas, para garantir que o efeito de hormesis possa ocorrer e ficar restrito a cultura. Com a interação de glyphosate com os teores de fósforo e lignina estudos que abordem esse tema são importantes. Por fim entender todos os mecanismos envolvidos na hormesis por meio de ferramentas de sequenciamento genético se tornam a fronteira para a geração de novos conhecimentos, viabilizando estudos dessa magnitude em soja. A hormesis em soja pode proporcionar incrementos em desenvolvimento e até mesmo em produtividade de grãos, devendo ser testado a campo.

Nesse contexto, os objetivos do presente trabalho foram entender os efeitos no teor de lignina, fósforo, componentes da rota do ácido chiquímico, parâmetros de crescimento, produtividade bem como por meio de RNASeq entender quais os genes e vias enriquecidas pela aplicação de subdoses de glyphosate em soja NR, RR e RR2.

CAPÍTULO 1

SUBDOSES DE GLYPHOSATE EM SOJA COM APLICAÇÃO FOLIAR E NO TRATAMENTO DE SEMENTES¹

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a aplicação de subdoses de glyphosate foliar e no tratamento de sementes em soja NR, RR e RR2. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação. Um experimento foi conduzido no esquema fatorial 3 x 11, com três cultivares de soja, NR, RR e RR2, com a aplicação de 11 doses de glyphosate (0; 5,65; 11,25; 22,5; 45; 90; 180; 360; 720; 1440 e 2880 g e.a ha⁻¹). O glyphosate foi aplicado no tratamento de sementes e via foliar. O segundo experimento foi conduzido no esquema fatorial 4 x 3, foram utilizadas duas cultivares de soja RR e duas de RR2, com aplicação de três doses de glyphosate (0; 90 e 180 g e.a ha⁻¹), no tratamento de sementes. Na aplicação foliar de glyphosate no cultivar NR o intervalo de doses de 5,6-45 g e.a ha⁻¹, já na RR o intervalo de 45-720 g e.a ha⁻¹ e RR2 o intervalo de doses 11,25-180 g e.a ha⁻¹, proporcionaram incremento de acúmulo de biomassa de 12-28% em relação a testemunha. No tratamento de sementes para a cultivar NR o intervalo de doses de 45-180 g e.a ha⁻¹, na cultivar RR as doses de 90-360 g e.a ha⁻¹ e para a cultivar RR2 o intervalo de 90-180 g e.a ha⁻¹, proporcionaram incremento de acúmulo de biomassa de 16-60% em relação a testemunha. As doses de 90 e 180 g e.a ha⁻¹ de glyphosate no tratamento de sementes, proporcionou maior crescimento e acúmulo de biomassa para as cultivares de soja RR e RR2. As subdoses de glyphosate via foliar e no tratamento de sementes proporcionaram maior crescimento e acúmulo de biomassa nas cultivares de soja.

Palavras-chave: hormesis; taxa de crescimento absoluto; taxa de crescimento relativo; *Glycine max* (L.) Merrill; soja transgênica; resistência a glyphosate.

GLYPHOSATE SUBDOSES IN SOYBEAN NR, RR AND RR2 WITH FOLIAR AND SEED TREATMENT APPLICATION

Abstract

¹ Os capítulos da tese estão redigidos de acordo com as normas do periódico Pest Management Science

The objective of the present work was to evaluate the glyphosate application of low doses on leaf and seed treatment in RR, RR2 and NR soybeans cultivars. For that, experiments were carried out in a greenhouse, in a completely randomized design. The first experiment in the 3 x 11 factorial scheme, three soybean cultivars were used, one NR, one RR and one RR2, with the application of 11 doses of glyphosate (0; 5.65; 11.25; 22.5; 45 ; 90; 180; 360; 720; 1440 and 2880 g a.e ha⁻¹). Glyphosate was applied in seed treatment and by foliar application. The second conducted in the 4 x 3 factorial scheme, two soybean cultivars RR and RR2 were used, with the application of three doses of glyphosate potassium salt (0; 90 and 180 g a.e ha⁻¹), in the treatment of seeds. For foliar application of glyphosate in the cultivar NR, the dose range of 5.6-45 g a.e ha⁻¹, for RR cultivar the range of 45-720 g a.e ha⁻¹ and RR2 the dose range 11.25- 180 g a.e ha⁻¹, provided an increase in biomass accumulation of 12-28% in relation to the control. In the treatment of seeds for the cultivar NR the dose range of 45-180 g a.e ha⁻¹, for the cultivar RR the doses of 90-360 g a.e ha⁻¹ and for the cultivar RR2 the range of 90-180 g a.e ha⁻¹, provided an increase in biomass accumulation of 16-60% in relation to the control. The doses of 90 and 180 g a.e ha⁻¹ of glyphosate in seed treatment, provided greater growth and accumulation of biomass for soybean cultivars RR and RR2. The low doses of glyphosate via leaf and seed treatment provided greater growth and accumulation of biomass in soybean cultivars.

Keywords: hormesis; absolute growth rate; relative growth rate; *Glycine max* (L.) Merrill; transgenic soybeans; glyphosate resistance.

1.1 INTRODUÇÃO

A soja apresenta-se como a principal oleaginosa do mundo, sendo cultivada em aproximadamente 127 milhões de hectares com produção total de 362 milhões de toneladas (USDA, 2022). No Brasil são cultivados em torno de 38 milhões de hectares com produção total de 135 milhões de toneladas com produtividade média de 3517 kg por hectare (CONAB, 2022). A produtividade média brasileira está aquém das encontradas em áreas manejadas para altas produtividades, no qual as médias podem chegar a aproximadamente 7380 kg por hectare (CESB, 2020). Isso demonstra o potencial produtivo da soja e a demanda por novas tecnologias desenvolvidas para incrementar e elevar a média de produtividade da soja brasileira.

O glyphosate é um dos herbicidas mais utilizados no mundo, e atua no bloqueio da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintetase (EPSPs), que catalisa a reação na qual o chiquimato-3-fosfato reage com fosfoenolpiruvato, formando 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato e fósforo inorgânico (FRANZ et al., 1997, DILL et al., 2008). A inibição da EPSPs pela ação do glyphosate, afeta a rota metabólica do ácido chiquímico, a qual produz três aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano, e induz a planta a morte (BENTLEY, 1990).

A resistência ao glyphosate é conferida às plantas de soja RR e RR2, pela inserção do gene *cp4-epsps* oriundo de *Agrobacterium* sp, que produz uma enzima EPSPs insensível ao glyphosate (DILL et al., 2008). Os materiais RR e RR2 diferem entre si na construção do plasmídeo, no qual a soja RR apresenta o gene *cp4-epsps* original e o promotor 35S e a soja RR2 apresenta o gene *cp4-epsps* modificado e o promotor FMV (promotor do vírus do mosaico da escrofulária) (CTNBIO, 2018). Segundo GREEN (2018), a segunda geração de soja RR2 apresenta maiores vantagens em rendimento.

Estudos tem demonstrado que doses reduzidas de glyphosate tem sido reportada como estimuladoras para o crescimento de plantas, com efeito conhecido como Hormesis (BRITO et al., 2018; VELINI et al., 2008; DUKE et al., 2006). Esse efeito de subdoses de glyphosate tem sido demonstrado em diversas culturas com efeitos variados em crescimento e acúmulo de biomassa. Culturas como a soja, milho, cana-de-açúcar, café, eucalipto e pinus apresentaram incremento em características morfológicas, como incremento em biomassa de raiz e parte área (BRITO et al., 2018; NASCENTES et al., 2018; CARVALHO et al., 2013; VELINI et al., 2008; GODOY, 2007). Em soja (NR) não resistente ao glyphosate, VELINI et al., (2008), observou incremento de massa seca da parte área e radicular, porém sem encontrar diferença significativa para uma cultivar de soja RR. Vale destacar que as cultivares de soja RR e RR2 podem apresentar características diferentes daquela testada a anos atrás o que pode mudar os resultados da subdoses de glyphosate evidenciando a necessidade de novos trabalhos.

Porém o efeito da aplicação foliar de glyphosate também acontece em plantas daninhas como a buva e capim amargoso (ANUNCIATO et al., 2021; CESCO, 2018; GOMES, 2014), o que inviabiliza a aplicação em larga escala a campo quando há presença dessas plantas daninhas em soja. Com isso surge a necessidade de testar diferentes formas de aplicação de subdoses de glyphosate em soja, uma delas pode

ser junto ao tratamento de sementes. Diante da resposta positiva da aplicação de subdoses de glyphosate, presença de novas cultivares e da necessidade de investigar novas formas de aplicação de subdoses de glyphosate em soja, novos trabalhos tornam-se importantes para tornar essa prática aplicável a campo.

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a aplicação de subdoses de glyphosate foliar e no tratamento de sementes em soja RR, RR2 e NR.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Características gerais dos experimentos

Foram realizados dois experimentos, conduzidos em casa de vegetação no Núcleo de Pesquisas avançadas em Matologia – Nupam, localizado na Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA, da Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’ Campus de Botucatu – SP. O primeiro experimento foi realizado para avaliar a aplicação foliar e no tratamento de sementes de subdoses de glyphosate em plantas de soja não resistente ao glyphosate (NR), e soja resistente ao glyphosate, com o gene *cp4-epsps* de primeira RR e segunda geração RR2. O ensaio dois foi realizado para avaliar a aplicação de glyphosate no tratamento de sementes em quatro cultivares de soja RR e RR2. Os dois experimentos foram repetidos em dois momentos distintos, durante a primavera e verão. As condições proporcionadas pela casa de vegetação foram de temperaturas médias em torno de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar em 60 % e luz natural. A irrigação dos vasos foi adotada como padrão de 250 ml de água por dia, medida com proveta e adicionada aos vasos.

Para compor as unidades experimentais, foram utilizados vasos com capacidade de 1,8 litros, preenchidos com substrato Carolina® composto por turfa de esfagno, vermiculita e casca de arroz carbonizada, com pH 5,7 ($\pm 0,5$). Foram semeadas 10 sementes por vaso, e após a emergência, foi realizado um desbaste para que permanecessem quatro plantas viáveis de soja, por vaso. No experimento dois foram utilizadas bandejas de plástico com 40 células de capacidade de 0,5 litros que também foram preenchidas com substrato. Em cada célula foram semeadas uma semente de soja.

1.2.2 Experimento 1. Subdoses de glyphosate em soja NR, RR e RR2 com a aplicação via foliar e tratamento de sementes.

O delineamento utilizado para os experimentos foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições, no esquema fatorial 3 x 11 (cultivares x doses de glyphosate), com cinco repetições. Foram utilizadas três cultivares de soja, uma NR a CD 283, uma RR BMX Tornado e outra RR2 M 5917 IPRO, com a aplicação de 11 doses de glyphosate sal de potássio (0; 5,65; 11,25; 22,5; 45; 90; 180; 360; 720; 1440 e 2880 g e.a ha⁻¹). As cultivares foram escolhidas de acordo com a sua utilização pelos produtores.

Os tratamentos foram aplicados quando as plantas de soja se apresentavam no estágio vegetativo de V3 (três trifólios totalmente expandidos). Para as aplicações foram utilizados um pulverizador, instalado em sala de aplicação fechada, com pressão advinda de ar comprimido, equipado com um lança de aplicação com seis pontas XR 110.02, espaçadas entre si por 0,5 m e posicionadas a 0,5 m de altura em relação às plantas, com pressão constante de 2 bar e uma velocidade de deslocamento de 1 m s⁻¹, gerando um volume de calda de 200 l ha⁻¹. O tratamento de sementes foi simulado pelo método “on farm”, misturando-se a dose de glyphosate junto do adjuvante organosiliconado (Silwet® na concentração de 0,05%) em saco plástico até observar que todas as sementes se apresentavam tratadas. Para cada tratamento e dose foram tratados 100 gramas de sementes. Para o cálculo da dose aplicada via tratamento de sementes, foi estimado a quantidade necessária de sementes para plantar um hectare em seguida foi calculada para as 100 gramas de sementes. Após o tratamento as sementes ficaram a sombra para secar e posteriormente foram semeados.

Nos experimentos com aplicação foliar de glyphosate foram avaliadas a altura de plantas, a taxa de crescimento absoluto e relativo e massa da matéria seca das plantas de soja. Aos 14 e 28 DAA (dias após a aplicação) foram avaliados a altura de plantas, medindo-se da superfície do solo até o último trifólio totalmente expandido do ápice da planta. Para calcular a taxa de crescimento absoluto (TCA; g dia⁻¹) e relativo (TCR; g g⁻¹ dia⁻¹), foram utilizadas as seguintes equações: $TCA = (P2 - P1) / (t2 - t1)$, e $TCR = (\ln P2 - \ln P1) / (t2 - t1)$, em que P2 e P1 são as biomassas secas de duas amostragens sucessivas e t2 e t1 são os dias decorridos entre as duas observações.

Aos 28 DAA as plantas foram cortadas e armazenadas em sacos de papel e posteriormente levadas a estufa de circulação forçada de ar, em temperatura de 60°C,

até peso constante. Posteriormente foram pesadas em balança com precisão de quatro dígitos. Nos tratamentos com glyphosate no tratamento de sementes foram avaliados somente a massa seca da parte aérea e radicular aos 14 DAE (Dias após a emergência).

1.2.3 Experimento 2. Crescimento inicial de cultivares de soja RR e RR2 com aplicação de subdoses de glyphosate no tratamento de sementes.

O delineamento utilizado para os experimentos foi o inteiramente casualizado, no esquema fatorial 4 x 3 (cultivares x doses de glyphosate), com cinco repetições, para cada época de coleta. Foram utilizadas quatro cultivares de soja, duas RR a BMX Tornado e a N5909, e duas cultivares RR2 M 5917 IPRO e M5838 IPRO, com a aplicação de três doses de glyphosate sal de potássio (0; 90 e 180 g e.a ha⁻¹). As cultivares foram escolhidas de acordo com a sua utilização pelos produtores. O tratamento de sementes foi realizado conforme indicação acima.

Aos 4, 8, 12, 16 e 20 DAE (dias após a emergência), as cinco repetições de cada época foram coletadas e secas em estufa com circulação de ar forçado, para obtenção da biomassa seca. Também nesses dias foram calculas o TCA (g dia⁻¹) e TCR (g g⁻¹ dia⁻¹), da mesma foram já mencionadas acima.

1.2.4 Análise dos dados

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, posteriormente foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e quando significativos, foi realizado o teste de média T (LSD) (p≤0,05), foram realizados todos os desdobramentos necessários. Foi realizada análise conjunta para os experimentos em duplicata. Para a curva de doses foram utilizados os modelos apresentados por BRAIN e COUSENS (1989) e adaptados por VELINI et al, (2008) com a finalidade de descrever curvas de dose resposta com estímulo ao crescimento Equação 1, ou sem estímulo ao crescimento Equação 2, após a aplicação de glyphosate. Quando não significativos para nenhuma das equações os dados foram submetidos ao teste de média T (LSD) (p≤0,05). Para estes dados será utilizado o programa estatístico R e para confecção dos gráficos o programa Sigmaplot 12.5.

$$\text{Equação 1: } y = F(x) = c + \frac{d-c + fx}{1+\exp(b(\log(x)-\log(e)))}$$

$$\text{Equação 2: } y = F(x) = c + \frac{d-c}{1+\exp(b(\log(x)-\log(e)))}$$

Os parâmetros “c” e “d” são os limites inferior, e superior, “b” é a inclinação relativa em torno de “e”, e o parâmetro “e” é o logaritmo do ponto de inflexão. Os modelos usados são diferentes em apenas um coeficiente adicional “f”. O parâmetro “f” é o valor de hormesis que ocorreu, sendo que se pode considerar verdadeiro o estímulo de hormesis quando esse parâmetro for diferente de 0 a 5% de probabilidade.

Para todos os dados, foi calculado o intervalo de confiança ($p=0,05$) da média (Equação 3) no software Microsoft Excel, o intervalo de confiança será adicionado as médias nos gráficos.

$$\text{Equação 3: } Ic = \frac{t * DP}{\sqrt{n}}$$

Onde, Ic = Intervalo de confiança, t = valor de t tabelado a 5%, DP = desvio padrão e $\sqrt{n}$ = raiz quadrada do número de repetições.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Subdoses de glyphosate em soja NR, RR e RR2 com a aplicação foliar

Os experimentos apresentaram semelhança de dados e não apresentaram diferença significativa pela análise conjunta, assim os dados foram apresentados com a média dos dois experimentos. A aplicação das doses de glyphosate influenciou a altura de plantas aos 14 e 28DAA, para a cultivar NR (CD283). Para a avaliação realizada aos 14 DAA observou-se que as doses de 5,6; 11,25 e 22,5 g e.a ha⁻¹ incrementaram a altura em 10,5, 14 e 15,5%, respectivamente em relação a testemunha sem aplicação. Para a altura avaliada aos 28DAA observou-se que as doses que apresentaram incremento foram 5,6; 11,25; 22,5 e 45 g e.a ha⁻¹ na ordem de 17, 12, 13 e 3% em relação a testemunha sem aplicação. As demais doses de glyphosate aplicado em soja NR reduziram significativamente a altura das plantas aos 14 e 28DAA. Para TCA e TCR observou-se que o intervalo de doses que ocorreu incremento foi de 5,6 a 45 g e.a ha⁻¹ diferindo significativamente das demais doses e da testemunha sem aplicação. Em TCA o incremento foi de 21, 28, 22 e 18%, respectivamente para as doses 5,6; 11,25; 22,5 e 45 g e.a ha⁻¹, relação a testemunha sem aplicação de glyphosate. Para TCR o incremento foi de 8, 12, 9 e 8%, respectivamente para as doses 5,6; 11,25; 22,5 e 45 g e.a ha⁻¹, em relação a testemunha sem aplicação de glyphosate. As demais doses de glyphosate causaram redução das taxas de crescimento (Figura 1).

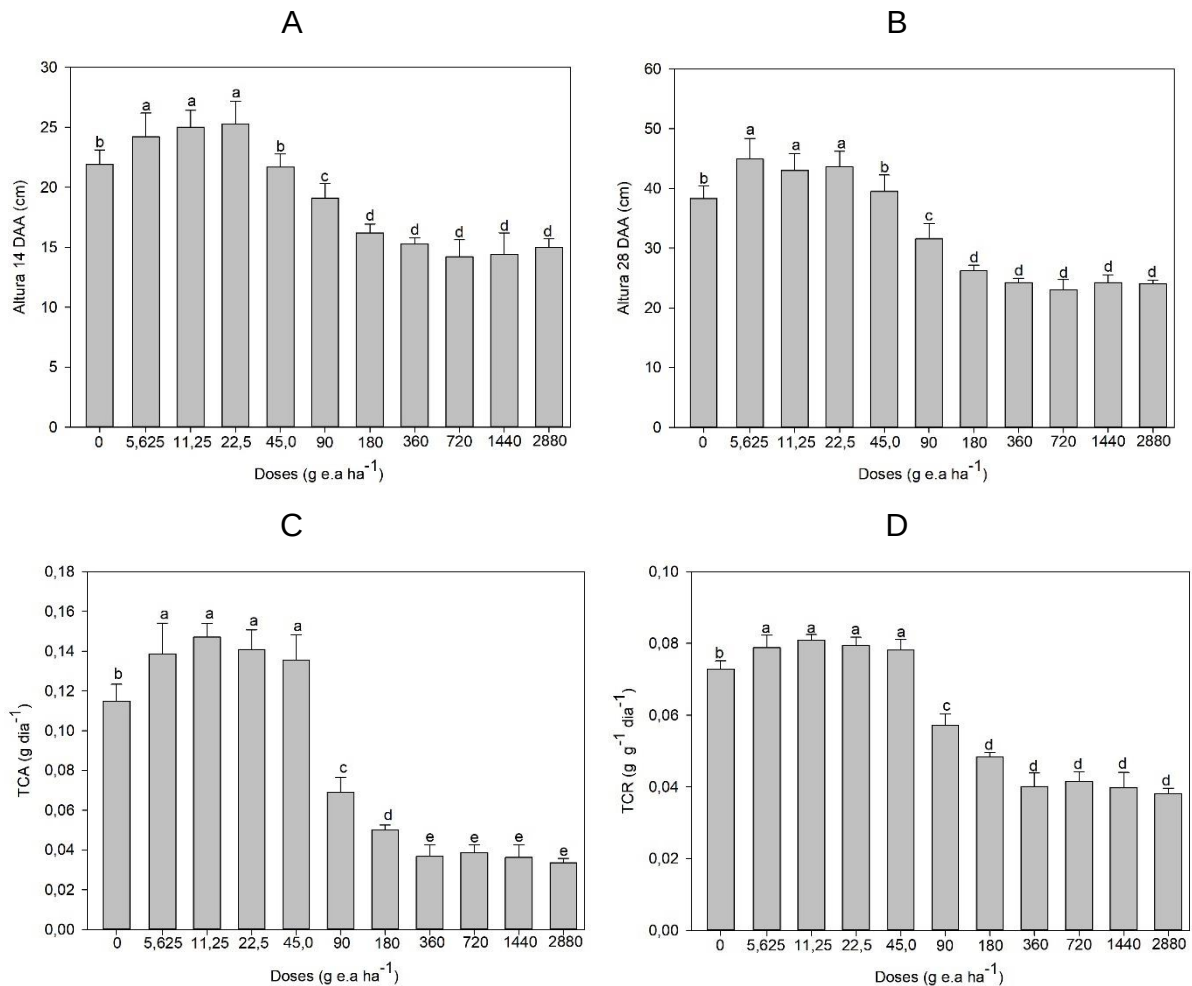


Figura 1. Altura das plantas aos 14 e 28 DAA (AB) e TCA (C) e TCR (D) do cultivar de soja não resistente ao glyphosate (CD383) após a aplicação de subdoses de glyphosate via foliar. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Em relação a massa da matéria seca das plantas de soja NR, foi possível ajustar o modelo de hormesis de BRAIN e COUSENS (1989) com adaptações de VELINI et al, (2008), no qual o intervalo de doses que compreende 5,6 a 45 g e.a ha⁻¹ apresentaram incremento de massa na ordem de 18 a 24% em relação a testemunha sem aplicação, demonstrando efeito de hormesis. As demais doses de glyphosate influenciaram negativamente a produção de biomassa das plantas de soja NR (Figura 2).

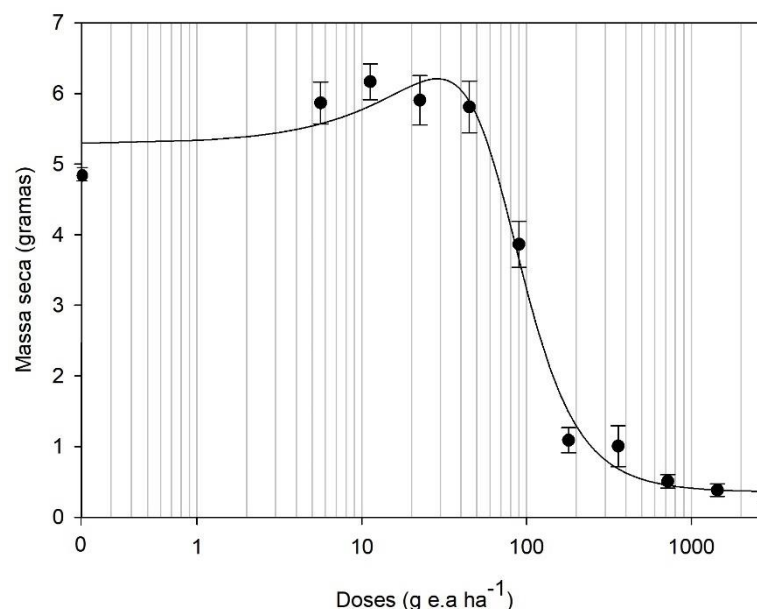


Figura 2. Massa da matéria seca do cultivar de soja não resistente ao glyphosate (CD383) 28 dias após a aplicação de subdoses de glyphosate via foliar. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Equação: $y = 0,035 + 1 + \exp(2,60 * (\log(x) - \log(70))) / 5,28 - 0,35 + fx$. $R^2 = 0,90$. ($p = 0,0001$).

Para a cultivar RR (BMX Tornado) observa-se comportamento distinto do cultivar NR, no qual o intervalo de doses de glyphosate que apresentaram incremento em altura aos 14 e 28 DAA foi de 11,25 até 180 g e.a ha⁻¹, essas doses apresentaram incremento no intervalo de 14-19% e 16-23% em relação a testemunha sem aplicação de glyphosate, respectivamente aos 14 e 28DAA. As doses de glyphosate acima de 360 g e.a ha⁻¹ resultaram em redução da altura de plantas, diferindo significativamente da testemunha sem aplicação. Quanto a TCA, observou-se que as doses de glyphosate que promoveram maior crescimento estão no intervalo entre 45 e 180 g e.a ha⁻¹, diferindo significativamente apenas da testemunha sem aplicação de glyphosate. O incremento de TCA foi de 15, 20 e 19% respectivamente para as doses de 45, 90 e 180 g e.a ha⁻¹ de glyphosate. Já para a taxa de crescimento relativo (TCR), não se observou diferenças significativas em relação as doses aplicadas (Figura 3).

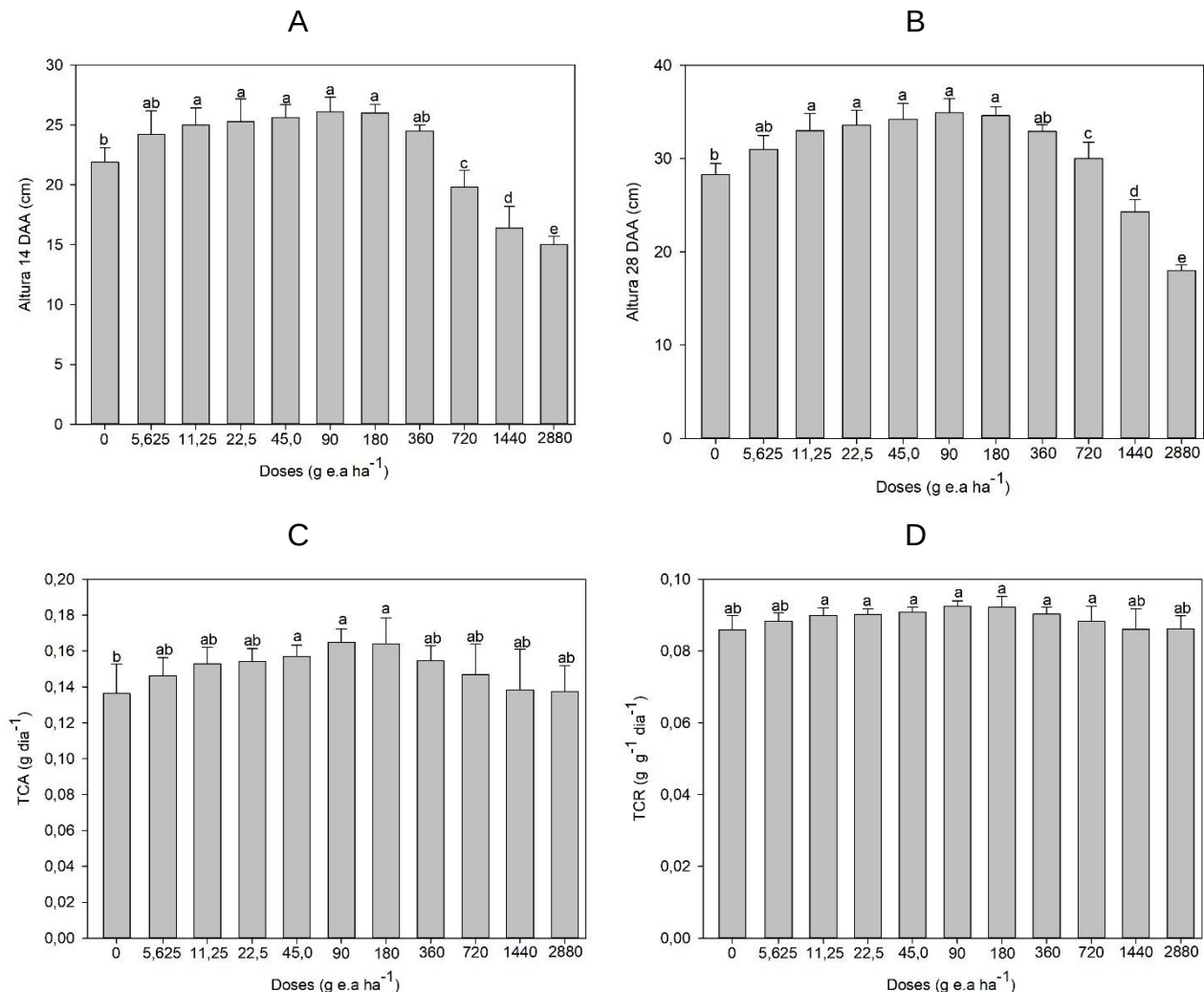


Figura 3. Altura das plantas aos 14 e 28 DAA (AB) e TCA (C) e TCR (D) do cultivar de soja RR (BMX Tornado) após a aplicação de subdoses de glyphosate via foliar. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Não foi possível ajustar o modelo de hormesis ou sem estímulo para os dados de massa da matéria seca do cultivar RR (BMX Tornado). Porém observou-se pelo teste de média que há diferenças significativas na aplicação das doses de glyphosate para esta variável. O intervalo de doses de 45 até 720 g e.a ha⁻¹ aumentaram significativamente a massa da matéria seca em relação a testemunha sem aplicação de glyphosate, não diferendo das demais doses de glyphosate. Esse intervalo de doses aumentou a massa da matéria seca de 12-16% em relação a testemunha sem aplicação (Figura 4).

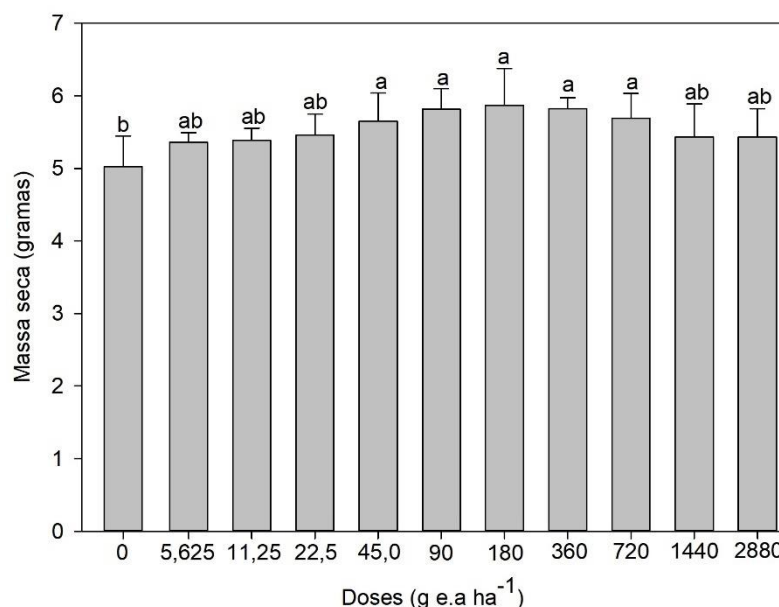


Figura 4. Massa da matéria seca do cultivar de soja RR (BMX Tornado) 28 dias após a aplicação de subdoses de glyphosate via foliar. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Para a altura de plantas aos 14 DAA, do cultivar de soja RR2 com aplicação de doses de glyphosate, observou-se que as doses de 1440 e 2880 g e.a ha⁻¹ apresentaram redução em altura, diferindo significativamente das demais doses e da testemunha sem aplicação. Já aos 28 DAA observou-se maior altura de plantas entre o intervalo de doses de 11,25 e 360 g e.a ha⁻¹, que diferiram significativamente das demais doses e da testemunha sem aplicação de glyphosate, esse intervalo de doses proporcionou incremento de 8-22% em relação a testemunha. As doses de 720 a 2880 g e.a ha⁻¹ reduziram a altura de plantas em relação aos demais tratamentos aos 28DAA. Para TCA e TCR observou-se que o intervalo de doses de 11,25 e 180 apresentaram taxas de crescimento maiores em relação a testemunha sem aplicação, esse incremento foi de 34-38% para TCA e 3-5% para TCR. As doses de 720 a 2880 g e.a ha⁻¹ reduziram TCA e TCR em relação as demais doses de glyphosate (Figura 5).

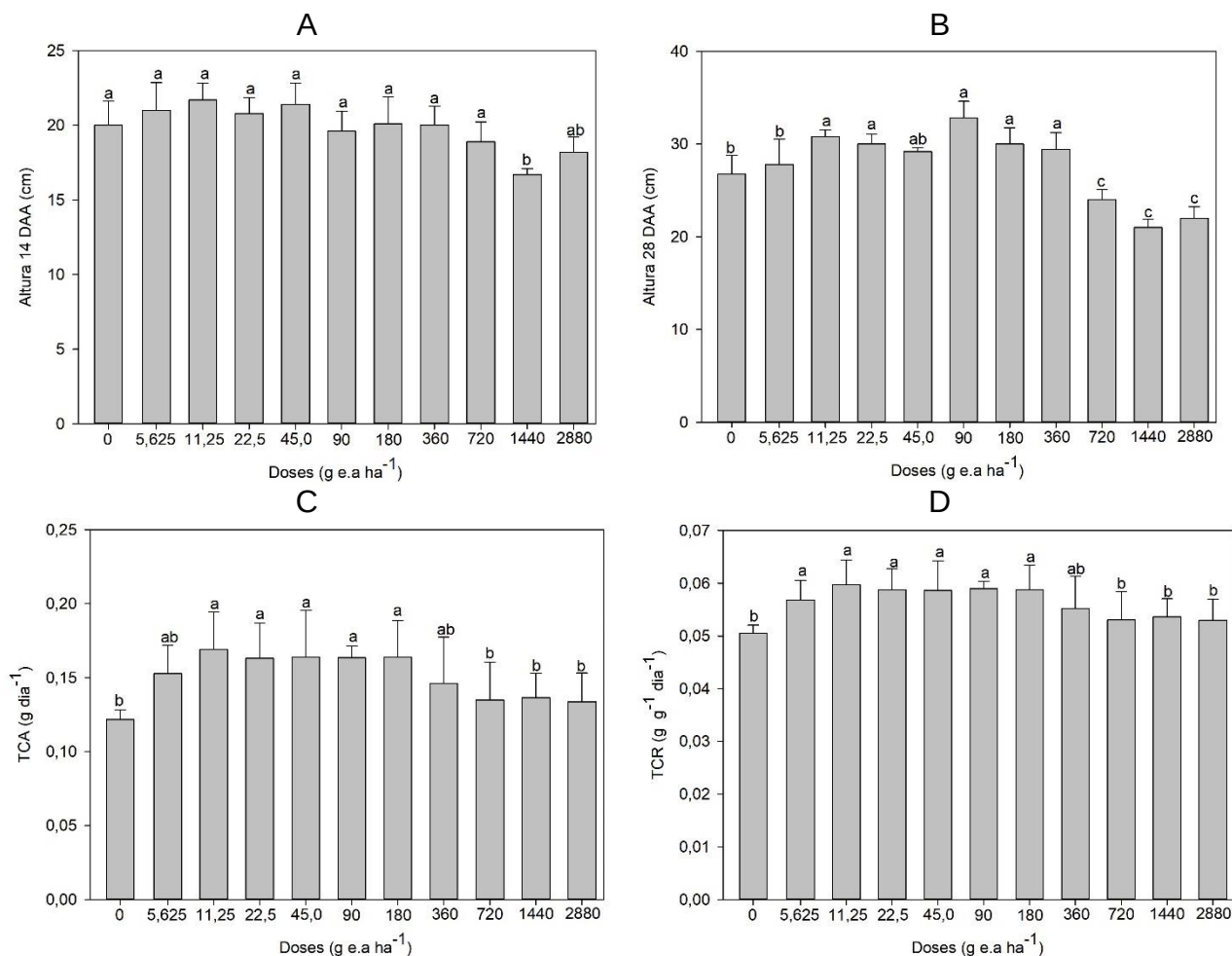


Figura 5. Altura das plantas aos 14 e 28 DAA (AB) e TCA (C) e TCR (D) do cultivar de soja RR2 (M 5917 IPRO) após a aplicação de subdoses de glyphosate via foliar. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Para os dados de massa da matéria seca do cultivar de soja RR2, também não foi possível ajustar os modelos de hormesis e sem estímulo. Pelo teste de média observou-se que o intervalo de doses de glyphosate de 11,25 a 180 g e.a ha⁻¹, apresentaram maior massa em relação a testemunha sem aplicação e em relação aos demais doses de glyphosate. Esse intervalo proporcionou um incremento de 25-28%, em relação a testemunha sem aplicação (Figura 6).

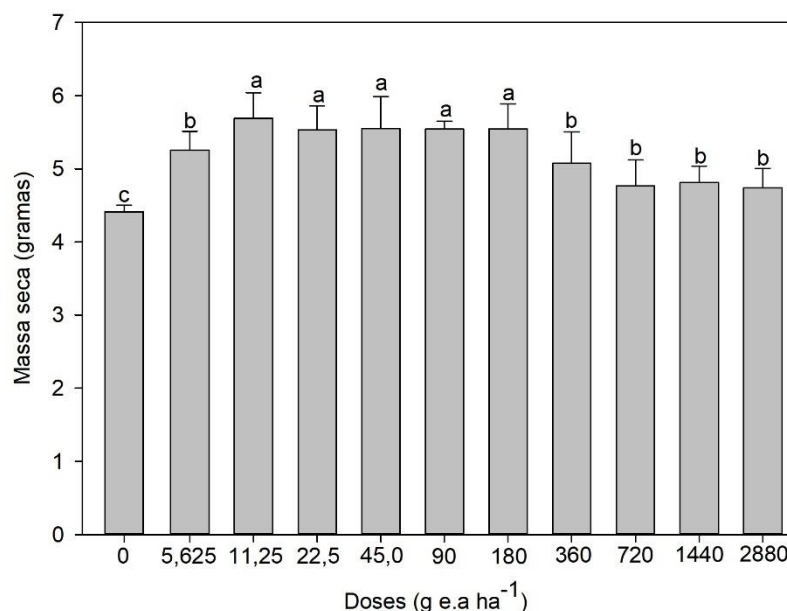


Figura 6. Massa da matéria seca do cultivar de soja RR2 (M 5917 IPRO) 28 dias após a aplicação de subdoses de glyphosate via foliar. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

1.3.2 Subdoses de glyphosate em soja NR, RR e RR2 com a aplicação no tratamento de sementes

Os experimentos apresentaram semelhança de dados e não apresentaram diferença significativa pela análise conjunta, assim os dados foram apresentados com a média dos dois experimentos. As doses de glyphosate no tratamento de sementes ocasionaram variação no acúmulo de biomassa para a cultivar NR. Para a biomassa total, da parte aérea e radicular das plantas da cultivar NR as doses de 45, 90 e 180 g e.a ha⁻¹, proporcionaram incremento em relação a testemunha sem o tratamento de sementes. Esses incrementos variam de 9-12% para massa da parte aérea, de 28-33% para massa da parte radicular e de 16-17% para biomassa total das doses 45, 90 e 180 g e.a ha⁻¹ de glyphosate no tratamento de sementes em relação a testemunha sem tratamento. Doses acima de 360 g e.a ha⁻¹ de glyphosate no tratamento de sementes resultaram em redução no acúmulo de biomassa para a cultivar NR, quando comparado as demais doses e testemunha (Figura 7).

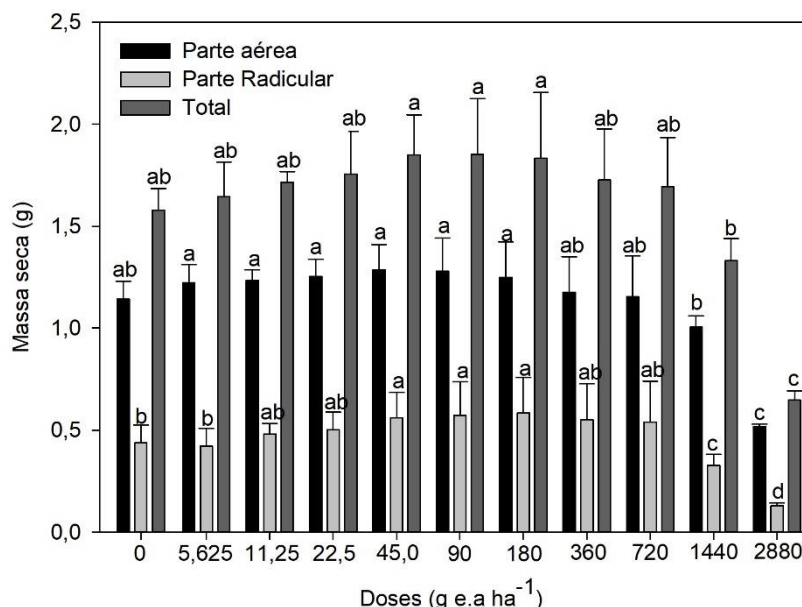


Figura 7. Massa da matéria seca do cultivar de soja não resistente ao glyphosate (CD383) 14 dias após a aplicação de subdoses de glyphosate via tratamento de sementes. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

A aplicação de glyphosate no tratamento de sementes proporcionou incremento de massa da matéria seca da parte aérea, radicular e total para a cultivar RR. Observa-se de maneira geral que as doses com maior incremento de biomassa nas plantas de soja RR foram as de 90 e 180 g e.a ha⁻¹, diferindo significativamente da testemunha sem o tratamento de sementes. As porcentagens de incremento para massa da parte aérea foram de 49 e 48%, para massa radicular de 97 e 96% e para parte aérea total foi de 60 e 59%, respectivamente para as doses de 90 e 180 g e.a ha⁻¹ de glyphosate em relação a testemunha sem aplicação. Doses glyphosate no tratamento de sementes acima de 360 g e.a ha⁻¹ causaram redução no acúmulo de biomassa para a cultivar RR (Figura 8).

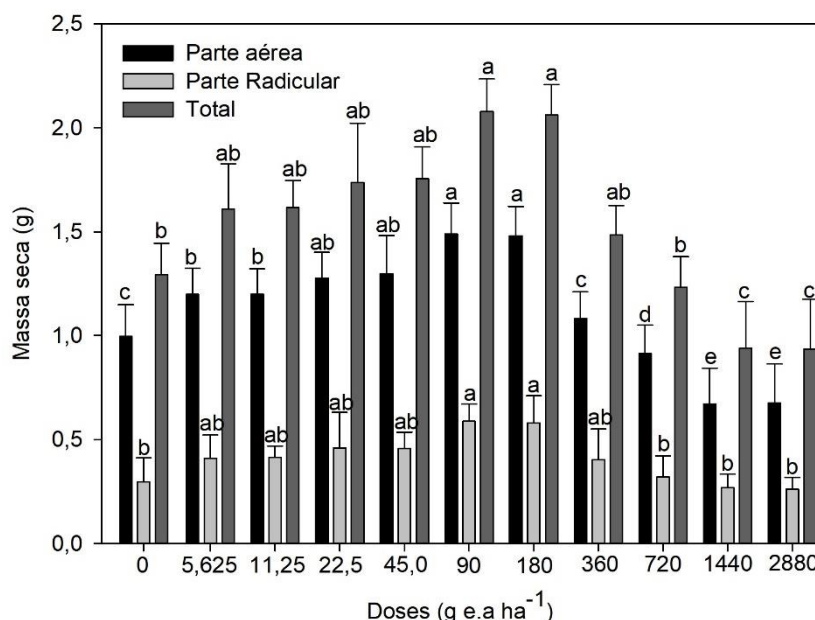


Figura 8. Massa da matéria seca do cultivar de soja RR (BMX Tornado) 14 dias após a aplicação de subdoses de glyphosate via tratamento de sementes. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Quanto ao comportamento das doses de glyphosate no tratamento de sementes da cultivar RR2, observa-se que elas influenciaram o acúmulo de biomassa nas plantas de soja. Para as variáveis de biomassa avaliadas as doses que proporcionaram maior incremento foram 90, 180 e 360 g e.a ha⁻¹. Para a massa seca da parte aérea o incremento médio foi de 36%, para a massa seca da parte radicular foi de 26% e para a biomassa total das plantas de soja RR2 foi de 36% das doses de 90, 180 e 360 g e.a ha⁻¹ de glyphosate no tratamento de sementes em relação a testemunha sem tratamento. Observa-se que as doses de 1440 e 2880 g e.a ha⁻¹ de glyphosate no tratamento de sementes ocasionaram redução de biomassa das plantas de soja RR2 em relação a testemunha sem o tratamento (Figura 9).

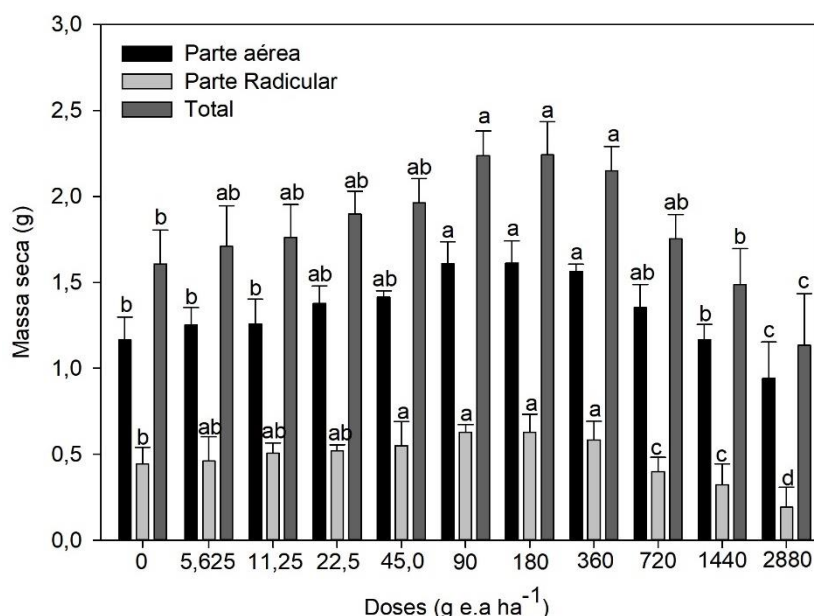


Figura 9. Massa da matéria seca do cultivar de soja RR2 (M 5917 IPRO) 14 dias após a aplicação de subdoses de glyphosate via tratamento de sementes. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

1.3.3 Crescimento inicial de cultivares de soja RR e RR2 com aplicação de subdoses de glyphosate no tratamento de sementes.

Os experimentos apresentaram semelhança de dados e não apresentaram diferença significativa pela análise conjunta, assim os dados foram apresentados com a média dos dois experimentos. Para as cultivares RR (N5909 e BMX Tornado) observou-se que as doses de 90 e 180 g e.a ha⁻¹ de glyphosate no tratamento de sementes proporcionaram incremento nas variáveis analisadas. Para massa da matéria seca observou-se que a partir da avaliação aos 12DAE as doses de glyphosate no tratamento de semente apresentaram maior acúmulo de biomassa diferindo significativamente da testemunha sem o tratamento. Esse comportamento perdura até os 20DAE data da última avaliação para as duas cultivares. Na TCA o comportamento foi novamente semelhante para as duas cultivares de soja RR. Nas avaliações de 16 e 20DAE é possível observar maior taxa de crescimento em g dia⁻¹ para o tratamento de sementes com glyphosate nas doses de 90 e 180 g e.a ha⁻¹, em relação a testemunha. No cultivar RR N5909 na TCR (g g⁻¹ dia⁻¹) é possível observar diferença a partir dos 12DAE com efeito até a última avaliação (20DAE). Nessas datas as doses de glyphosate no tratamento de sementes foram superiores a testemunha

sem aplicação. No cultivar BMX Tornado foi possível observar essa diferença entre os tratamentos somente aos 20DAE (Figura 10).

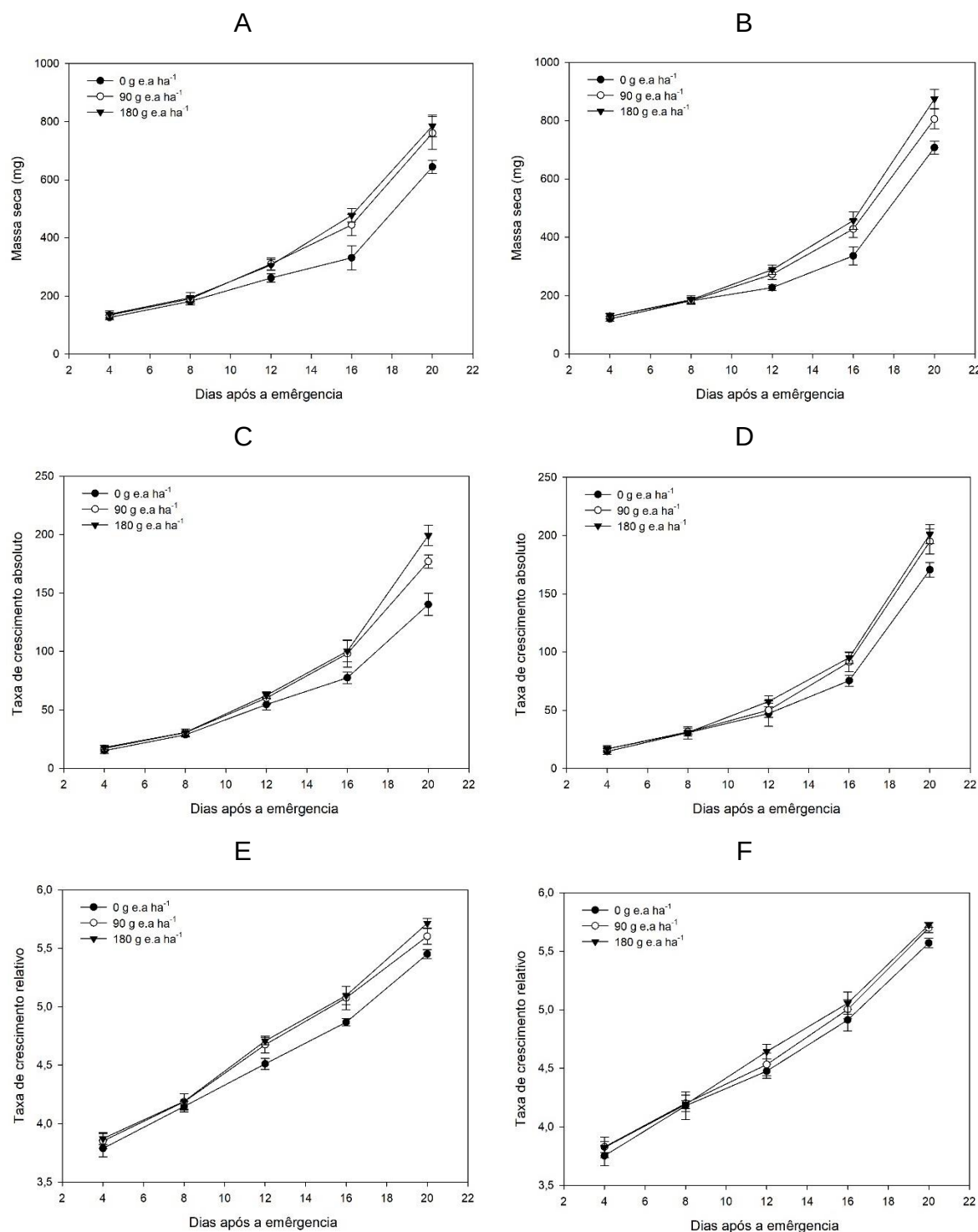
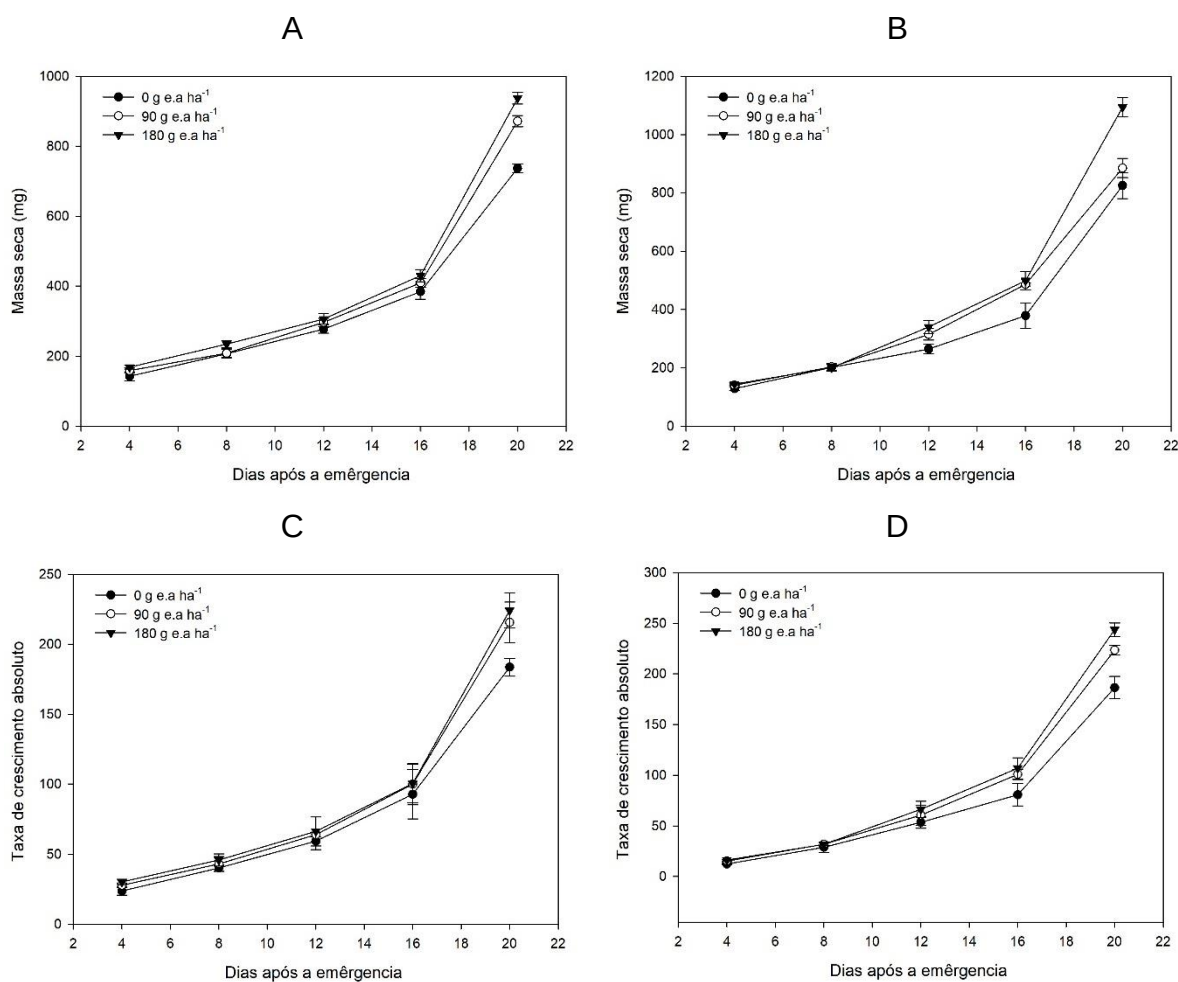


Figura 10. Massa da matéria seca, taxa de crescimento absoluto e relativo das cultivares de soja RR N5909 (ACE) e BMX Tornado (BDF), aos 4, 8, 12, 16 e 20 dias após a aplicação de glyphosate no tratamento de sementes, nas doses de 0, 90 e 180 g e.a ha⁻¹. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade).

O tratamento de semente com o glyphosate nas doses de 90 e 180 g e.a ha⁻¹, resultou em maior acúmulo de biomassa nas cultivares de soja RR2 (M5917 e M5838), aos 16 e 20DAE, diferindo significativamente das testemunha sem o tratamento de sementes. Em relação as taxas de crescimento, observou-se que em TCA as doses de glyphosate no tratamento de sementes apresentaram maior crescimento diário em g dia⁻¹, diferindo significativamente da testemunha sem aplicação aos 20 DAE. Já para TCR não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos aplicados (Figura 11).



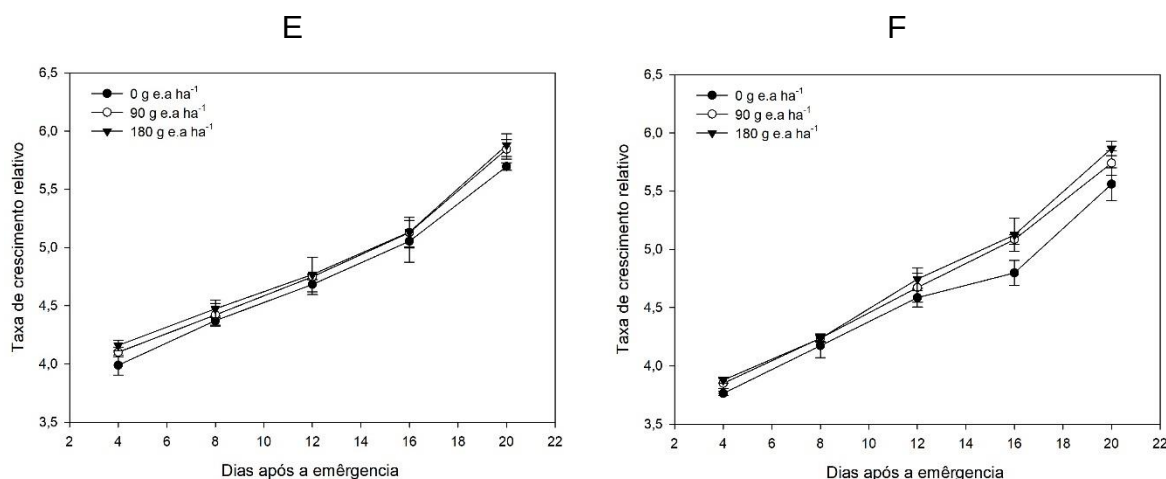


Figura 11. Massa da matéria seca, taxa de crescimento absoluto e relativo das cultivares de soja RR2 IPRO M5917 (ACE) e M5838 (BDF), aos 4, 8, 12, 16 e 20 dias após a aplicação de glyphosate no tratamento de sementes, nas doses de 0, 90 e 180 g e.a ha⁻¹. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade).

1.4 DISCUSSÃO

1.4.1 Subdoses de glyphosate em soja NR, RR e RR2 com a aplicação foliar

Tratamentos que proporcionam crescimento mais rápido das cultivares de soja permitem que a planta se estabeleça de maneira mais eficiente na área, podendo fazê-la aproveitar melhor o ambiente e reduzir a competição com as plantas daninhas (VITORINO et al., 2017). Assim o tratamento com subdoses de glyphosate (5,6 a 45 g e.a ha⁻¹) na cultivar de soja NR pode proporcionar a mesma um crescimento mais rápido e consequentemente maior acúmulo de biomassa, quando comparado com as plantas sem o tratamento. O efeito de hormesis para a massa da matéria seca em cultivares de soja NR, já foram relatadas por outros autores. Para o trabalho de SILVA et al., 2016 o intervalo de doses com maior resposta foi de 1,8; 3,6 e 7,2 g e.a ha⁻¹ para a cultivar Embrapa 48. Na cultivar CD201 o intervalo de doses que proporcionou hormesis foi de 1,8–36 g e.a ha⁻¹ (VELINI et al., 2008). Para este trabalho o intervalo foi de doses que promoveram a hormesis foi maior do que o observado nos trabalhos citados. Diferenças de doses, em diferentes trabalhos e diferentes cultivares de soja podem acontecer devido a complexa interação de fatores que causam o efeito de hormesis (BRITO et al., 2018; BELZ e DUKE, 2014; BELZ et al., 2011; VELINI et al., 2008).

Embora não foi possível a aplicação da equação de hormesis observou-se que para a cultivar de soja RR ocorreu estímulo de glyphosate para o intervalo de doses de 45 até 720 g e.a ha⁻¹ para o acúmulo de biomassa e elas diferiram significativamente da testemunha. Em trabalho de VELINI et al., 2008 foi observado que a aplicação de glyphosate em soja RR não proporcionou incremento no acúmulo de biomassa e atribui esse fato a não inibição da enzima EPSPs o que não causaria estresse a planta. Outros trabalhos têm demonstrado maiores rendimentos de grãos, maiores teores de nutrientes nos grãos e incrementos na germinação de sementes de soja RR e RR2 após a aplicação de sub doses de glyphosate (SILVA et al., 2018, BOMFIM et al., 2017). Diferentes comportamentos entre os trabalhos encontrados na literatura demonstram a complexidade dos acontecimentos envolvidos na resposta de culturas e cultivares a aplicação de subdoses de glyphosate (BRITO et al., 2018; BELZ e DUKE, 2014; BELZ et al., 2011; VELINI et al., 2008). Porém vale ressaltar que aplicação de doses acima de 720 g e.a ha⁻¹ podem reduzir o teor de clorofila, peso de sementes e produtividade de grãos (ALBRECHT et al., 2018; ALBRECHT et al., 2014).

Não há relatos de hormesis ou de estímulos de glyphosate em subdoses em soja RR2, porém assim como observado para a soja RR os resultados apresentados nesse trabalho demonstram incrementos em crescimento e acúmulo de biomassa para as cultivares RR2. Porém alguns trabalhos relatam o aumento da fotossíntese líquida e da eficiência de carboxilação aos 40 DAA da dose de 720 g e.a ha⁻¹ de glyphosate (KRENCHINSKI et al., 2017). Os mesmos autores explanaram que esse efeito de aumento pode estar relacionado a uma recuperação das plantas de soja RR2 ou a um estímulo provocado pela dose de glyphosate. Assim como observado nesse trabalho com a aplicação de doses de glyphosate acima de 1440 g g e.a ha⁻¹ de glyphosate podem comprometer o desenvolvimento, acúmulo de biomassa e parâmetros fotossintéticos (CESCO et al., 2018a; KRENCHINSKI et al., 2017; ZOBIOLE et al., 2010).

Quando comparadas as três cultivares de soja NR, RR e RR2, ocorre um aumento das doses de glyphosate até 90, 180 e 360 g e.a ha⁻¹ que causam efeito de estímulo nas cultivares RR e RR2 em relação a NR. Uma das possíveis explicações para essa diferença é a presença do gene *cp4-epsps* que produz EPSPs insensível ao glyphosate (DILL et al., 2008), fazendo com que as doses necessárias para promover estresse nas plantas seja maior (CESCO et al., 2018a; KRENCHINSKI et al., 2017). Em plantas daninhas resistentes ao herbicida glyphosate também são

observadas a necessidade de doses maiores de glyphosate para gerar estímulos, como no caso de buva e capim-amargoso (ANUNCIATO et al., 2021; CESCO, 2018b; NADEEM et al., 2017; GOMES, 2014). Segundo BELZ e DUKE (2014) no caso de plantas resistentes ao glyphosate, doses que causam controle ou efeito de estímulo devem aumentar devido a menor quantidade de herbicida que chega ao sítio de ação devido aos mecanismos de resistência envolvidos. Como uma das hipóteses do efeito de estímulo de glyphosate é associada a inibição da enzima EPSPs, subdoses são suficientes para proporcionar um pequeno estresse em plantas não resistentes ao glyphosate, proporcionando incremento de crescimento e biomassa (VELINI et al., 2008; BRITO et al., 2018; DUKE et al., 2006).

1.4.2 Subdoses de glyphosate em soja NR, RR e RR2 com a aplicação no tratamento de sementes

Não foi possível ajuste do modelo de hormesis (equação 1), porém observa-se que para as três cultivares testadas NR, RR e RR2 algumas doses de glyphosate no tratamento de sementes ocasionaram maior acúmulo de biomassa das plantas de soja. Na cultivar NR o intervalo de doses de 45 a 180 g e.a ha⁻¹ de glyphosate ligeiramente maior do que encontrado nesse estudo (5,6 a 45 g e.a ha⁻¹) e em outros estudos com soja NR com 1,8 a 7,2 g e.a ha⁻¹ (SILVA et al., 2016) e 1,8–36 g e.a ha⁻¹ (VELINI et al., 2008). Está maior dose para ocorrer incremento no tratamento de sementes pode estar relacionada com a menor absorção do tegumento das sementes antes da semeadura (MERTZ et al., 2009), ou pelas características do glyphosate quando está no solo de rápida sorção aos coloides, formação de quelatos com íons metálicos, ligações com substâncias húmicas e pela rápida degradação por microrganismos quando está na solução do solo (REGITANO, 2009; MCBRIDE, 1994; FENG e THOMPSON, 1990; MIANO et al., 1992; PRATA et al., 2000). Em plântulas de soja RR a aplicação de glyphosate em diferentes concentrações em areia esterilizada, resultou em maior massa de raiz e parte aérea aos 7 dias após o tratamento (NEPOMUCENO et al., 2017). Observou-se que a resposta de estímulo proporcionou crescimento da planta como um todo (parte aérea e radicular) demonstrando que há alocação de recursos por toda a planta (CARVALHO et al., 2013).

A aplicação de subdoses de glyphosate no tratamento de sementes apresenta potencial de utilização em campo pelos resultados apresentados, uma vez que pode

substituir a aplicação foliar. Sabe-se que a aplicação foliar além de provocar estímulo nas plantas cultivadas como a soja, pode também provocar estímulo em plantas daninhas como a buva (CESCO, 2018b; GOMES, 2014), capim amargoso (ANUNCIATO et al., 2021) e trapoeraba (VELINI et al., 2008), dificultando a aplicação de sub doses de glyphosate em áreas com presença dessas plantas daninhas. Com a aplicação localizada no tratamento de sementes o efeito fica restrito as plantas de soja e possivelmente para o efeito em microrganismos (MORANDI, 1989), porém este último merece destaque em outros estudos.

O efeito de estímulo de uma determinada substância sobre algum organismo está diretamente condicionado pelas condições ambientais, que quando favoráveis auxiliam as respostas fisiológicas que o efeito de hormesis pode provocar, sendo que algumas dessas respostas podem ser tentativas de compensar o estresse químico (CALABRESE, 2014; CALABRESE e MATTSON, 2011). Nesse trabalho observamos que a forma de aplicação também pode influenciar na resposta hormesis. A resposta de estímulo foi maior quando o glyphosate foi aplicado no tratamento de sementes em comparação a aplicação foliar. A resposta das cultivares de soja com glyphosate no tratamento de sementes foi em torno de 16 a 60% de incremento na massa da matéria seca em relação a testemunha, enquanto na aplicação foliar de glyphosate a amplitude das respostas foi de somente 12 a 28% de acúmulo de biomassa em relação a testemunha. Assim o tratamento de sementes pode ser considerado uma forma alternativa de aplicação de sub doses glyphosate a fim de proporcionar o efeito de estímulo nas plantas.

1.4.3 Crescimento inicial de cultivares de soja RR e RR2 com aplicação de subdoses de glyphosate no tratamento de sementes.

Como demonstrado nas figuras 10 e 11 as doses de glyphosate de 90 e 180 g e.a ha⁻¹ proporcionaram maior acúmulo de biomassa para as cultivares RR e RR2 em virtude de uma velocidade de crescimento maior no mesmo tempo, evidenciada pelas taxas de crescimento absoluto e relativo. Um maior crescimento com maior volume de biomassa favorece as plântulas de soja em competição com as plantas daninhas pois a soja ocupa a área mais rápido reduzindo os períodos de interferência com as plantas daninhas (VITORINO et al., 2017). Observa-se que as cultivares de soja RR e RR2 apresentaram resultados semelhantes quanto a aplicação das subdoses de glyphosate no tratamento de sementes, e esses resultados perduraram até o fim das

avaliações. Em cevada a aplicação de subdoses de glyphosate via foliar, as características incrementadas pelo efeito de hormesis permaneceram até a colheita (CEDERGREEN e OLESEN, 2010; CEDERGREEN, 2008). Segundo BELZ e DUKE (2014) o tamanho da janela em que ocorre o efeito de hormesis depende do composto utilizado e a espécie de plantas que são expostas a ele, e a interação dessas janelas com o efeito de hormesis e condições ambientais podem favorecer ou dificultar a resposta hormética e em alguns casos a torna imprevisível.

Embora o efeito de hormesis de glyphosate não seja compreendida, há algumas hipóteses da possível causa do efeito. Uma delas se refere ao glyphosate provocar um pequeno estresse nas plantas o que possibilita uma rápida recuperação da planta e consequentemente rápido crescimento em relação as demais plantas. Outra hipótese aceita é que o efeito de hormesis do glyphosate se dá pela redução da enzima EPSPs disponível para a rota do ácido chiquímico, e como a lignina depende dessa rota, há redução dos seus níveis, de modo suficiente para particionar uma maior quantidade de carbono à produção de sacarose, aumentando assim o crescimento da planta (BELZ e DUKE, 2014; VELINI et al., 2008, DUKE et al., 2006). Ainda os maiores crescimentos e acúmulos de biomassa podem se dar pelo aumento na absorção de fósforo (GODOY 2007; PEREIRA et al., 2019). Porém maiores estudos envolvendo todas as hipóteses devem ser realizados para compreender o mecanismo em que ocorre o efeito de estímulo de glyphosate em plantas, e com isso ser possível a utilização do mesmo em campo.

1.5 CONCLUSÕES

Observou-se que a aplicação de subdoses de glyphosate via foliar e no tratamento de sementes proporcionou incremento de crescimento e acúmulo de biomassa em cultivares de soja NR, RR e RR2. A aplicação de subdoses de glyphosate pode ser realizada no tratamento de sementes com resultados superiores ao da aplicação foliar.

1.6 REFERÊNCIAS

Albrecht AJP, Albrecht LP, Krenchinski FH, Placido HF, Lorenzetti JB, Victoria Filho R e Barroso AAM. Behavior of RR soybeans subjected to different formulations and rates of glyphosate in the reproductive period. *Planta Daninha* 32:851-859 (2014).

Albrecht AJ, Albrecht LP, Barroso AA, Cesco VJ, Krenchinski FH, Silva AF, Placido HF, Rodrigues DM e Filho RV. Glyphosate tolerant soybean response to different management systems. *Journal of Agri. Sci.* 10: 204-216 (2018).

Anunciato VM, Bianchi L, Gomes GLGC, Velini ED, Duke SO, Carbonari CA. Effect of low glyphosate doses on flowering and seed germination of glyphosate-resistant and -susceptible *Digitaria insularis*. *Pest Manage. Sci.* 78:1227-1239 (2021).

Belz RG, Cedergreen N, e Duke SO. Herbicide hormesis—can it be useful in crop production? *Weed Research* 51: 321-332 (2011).

Belz RG, e Duke SO Herbicides and plant hormesis. *Pest Manage. Sci.* 70:698-707 (2014).

Bentley R. The shikimate pathway – a metabolic tree with many branches. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 25:307-384 (1990).

Bomfim NCP, Costa BGP, Souza LA, Justino GC, Aguiar LF e Camargos LS. Glyphosate Effect on Nitrogen Fixation and Metabolization in RR Soybean. *Journal of Agricu. Sci.* 9:114-119 (2017).

Brain P, e Cousens R. An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research* 29:93-96 (1989).

Brito IP, Tropaldi L, Carbonari CA e Velini ED. Hormetic effects of glyphosate on plants. *Pest Manage. Sci.* 74:1064-1070 (2018).

Calabrese EJ e Mattson MP. Hormesis provides a generalized quantitative estimate of biological plasticity. *Journal of Cell Commun Signal* 5:25-38 (2011).

Calabrese EJ. Hormesis: from mainstream to therapy. *Journal of Cell Commun Signal* 8:289-291 (2014).

Carvalho LB, Alves PL e Duke SO. Hormesis with glyphosate depends on coffee growth stage. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85:813-822 (2013).

Cedergreen N. Is the growth stimulation by low doses of glyphosate sustained over time?. *Environmental pollution* 156:1099-1104 (2008).

Cedergreen N e Olesen CF. Can glyphosate stimulate photosynthesis?. *Pesticide Bioche. and Physio.* 96:140-148 (2010).

Cesb. Publicações. Disponível em: <http://www.cesbrasil.org.br/publicacoes/>. Acessado em: 20/02/2022.

Cesco VJS. Hormesis de glyphosate no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de biótipos de *conyza* spp. (2018b) 85p. Dissertação (Mestrado em Agricultura). Faculdade de Ciências agrônômicas, Unesp, Botucatu – SP.

Cesco VJS, Krenchinski FH, Rodrigues DM, Nardi R, Albrecht AJP e Albrecht LP. Agronomic performance of intacta RR2 soybean submitted to doses of glyphosate. *Planta Daninha*, 36:1-10 (2018).

Conab. Primeiro levantamento da safra de grãos. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>.

Acessado em: 23/02/2022.

Ctnbio. Liberação comercial de plantas de milho. Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial#/liberacao-comercial/consultar-processo>.

Acessado em: 21/02/2022.

Dill GM, Cajacob CA e Padgett SR. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. *Pest Manage. Sci.* 64:326-331 (2008).

Duke SO, Cedergreen N, Velini ED e Belz RG. Hormesis: is it an important factor in herbicide use and allelopathy? *Outlooks on Pest Manage.* 17:29-33 (2006).

Feng JC; Thompson DG. Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed 2: persistence in foliage and soils. *Journal of Agri. and Food Chemi.* 38:1118-1125 (1990).

Franz JE, Mao MK, Sikorski JA. Glyphosate: a unique global herbicide. American Chemical Society (1997)

Godoy MC. Efeitos do glyphosate sobre o crescimento e absorção de fósforo em soja. (2007) 43p. Dissertação (Mestrado em Agricultura). Faculdade de Ciências agrônômicas, Unesp, Botucatu – SP.

Gomes G. L. G. C. Caracterização bioquímica e morfofisiológica de populações de buva (*conyza* spp.) resistentes ao glyphosate. (2014). 112p. Tese (Doutorado em Agricultura). Faculdade de Ciências agrônômicas, Unesp, Botucatu – SP.

Green JM. The rise and future of glyphosate and glyphosate-resistant crops. *Pest Manage. Sci.* 74:1035-1039 (2018).

Guan X, Guo J, Shen P, Yang L e Zhang D. Visual and rapid detection of two genetically modified soybean events using loop-mediated isothermal amplification method. *Food Analy. Methods* 3:313-320 (2010).

- Krenchinski FH, Albrecht LP, Albrecht AJP, Cesco VJS, Rodrigues DM, Portz RL e Zobiolo LHS. Glyphosate affects chlorophyll, photosynthesis and water use of four Intacta RR2 soybean cultivars. *Acta physi. Plant.* 39:1-13 (2017).
- Mcbride MB. Environmental chemistry of soils. Oxford: Oxford University Press, (1994) 545 p.
- Mertz LM, Henning FA, Cruz HLD, Meneghello GE, Ferrari CDS e Zimmer PD Diferenças estruturais entre tegumentos de sementes de soja com permeabilidade contrastante. *Revi. Brasi. de Seme.* 31:23-29 (2009).
- Miano TM, Piccolo A, Celano G e Senesi N. Infrared and fluorescence spectroscopy of glyphosate-humic acid complexes. *Sci. of the Total Environ.* 123:83-92 (1992).
- Morandi D. Effect of xenobiotics on endomycorrhizal infection and isoflavonoid accumulation in soybean roots. *Plant Physio. and Bioche.* 27: 697-701 (1989).
- Nadeem MA, Abbas T, Tanveer A, Maqbool R, Zohaib A e Shehzad MA. Glyphosate hormesis in broad-leaved weeds: a challenge for weed management. *Archi. of Agrono. and Soil Sci.* 63:344-351 (2017).
- Nascentes RF, Carbonari CA, Simões PS, Brunelli MC, Velini ED e Duke SO. Low doses of glyphosate enhance growth, CO₂ assimilation, stomatal conductance and transpiration in sugarcane and eucalyptus. *Pest Manage. Sci.* 74:1197-1205 (2018).
- Nepomuceno M, Chinchilla N, Varela RM, Molinillo JM, Lacret R, Alves PL e Macias FA. Chemical evidence for the effect of *Urochloa ruziziensis* on glyphosate-resistant soybeans. *Pest Manage. Sci.* 73:2071-2078 (2017).
- Pereira FCM, Tayengwa R, Alves PLDCA e Peer WA. Phosphate Status Affects Phosphate Transporter Expression and Glyphosate Uptake and Transport in Grand Eucalyptus (*Eucalyptus grandis*). *Weed Science* 67:29-40 (2019).
- Prata F, Lavorenti A, Regitano JB e Tornisiolo VL. Influência da matéria orgânica na sorção e dessorção de glifosato em solos com diferentes atributos mineralógicos. *Revi. Brasile. de Ciê. do Solo* 24:947-951 (2000).
- Regitano JB. Sorção e dessorção do glyphosate no solo. In: VELINI, E. D. et al. Glyphosate. Fepaf: Botucatu, 493 p., (2009).
- Silva FML, Duke SO, Dayan FE e Velini ED. Low doses of glyphosate change the responses of soybean to subsequent glyphosate treatments. *Weed Research* 56: 124-136 (2016).

Silva MS, Oliveira GR, Lazarini E, Sá ME, Souza LA, Justino GC e Camargos LS. Glyphosate Stimulates the Accumulation of N-Compounds, Grain Yield and Seed Vigor in Glyphosate-Resistant Soybean. *Journal of Agri. Sci.* 10:157-160 (2018).

Usda. Crop production. Disponível em: <https://www.usda.gov/topics/farming/crop-production>. Acessado em: 20/02/2022.

Velini ED, Alves E, Godoy MC, Meschede DK, Souza RT e Duke SO. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. *Pest Manage. Sci.* 64:489-496 (2008).

Vitorino HDS, Silva Junior ACD, Gonçalves CG e Martins D. Interferência de plantas daninhas na cultura da soja em função do espaçamento de semeadura. *Revista Ciê. Agro.* 48:605-613 (2017).

Zobiole LHS, Kremer RJ, de Oliveira RS e Constantin J. Glyphosate affects photosynthesis in first and second generation of glyphosate-resistant soybeans. *Plant and soil* 336:251-265 (2010).

CAPÍTULO 2

TRANSCRIPTOMAS, EXPRESSÃO DE GENES E SUA RELAÇÃO COM OS TEORES DE LIGNINA, FÓSFORO, ETR E COMPONENTES DA ROTA DO ÁCIDO CHIQUIMICO EM PLANTAS DE SOJA APÓS A APLICAÇÃO DE GLYPHOSATE

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi identificar as vias enriquecidas e genes expressos e se os mesmos estão relacionados com o teor de lignina, fósforo, taxa de transporte de elétrons, componentes da rota do ácido chiquímico e biomassa em soja após a aplicação de sub doses de glyphosate. Foram realizados experimentos em casa de vegetação com delineamento inteiramente casualizado com 20 repetições, em esquema de fatorial duplo 3 x 3 (cultivares x tratamentos). Foram utilizadas cultivares de soja uma NR, RR e uma cultivar RR2, com aplicação de doses de glyphosate de 0, 11,25 e 22,5 g e.a ha⁻¹ para a cultivar NR e 0, 45 e 90 g e.a ha⁻¹ para as cultivares RR e RR2. Foram identificados 587 DEG presentes em diversas vias enriquecidas. Foram observadas vias de catabolismo de lignina, resultando em redução dos seus teores após a aplicação de glyphosate. As cultivares de soja apresentaram maior concentração de fósforo quando foram aplicadas com as sub doses de glyphosate, embora não tenha sido observada vias e genes relacionados a esse processo. Os componentes da rota do ácido chiquímico foram afetados com a aplicação de glyphosate, e parecem estar ligados a diversas vias enriquecidas. Para as três cultivares de soja a biomassa das plantas, foi incrementada com a aplicação das sub doses de glyphosate.

Palavras-chave: rnaseq; *Glycine max* (L.) Merrill; hormesis; estímulo de glyphosate.

TRANSCRIPTOMES, GENE EXPRESSION AND THEIR RELATIONSHIP WITH LIGNIN, PHOSPHORUS CONTENTS, ETR AND COMPONENTS OF THE CHICHEMIC ACID ROUTE IN SOYBEAN PLANTS AFTER THE APPLICATION OF GLYPHOSATE

Abstract

The objective of the present work was to identify the enriched pathways and expressed genes and whether they are related to the content of lignin, phosphorus, electron

transport rate, components of the shikimic acid pathway and biomass in soybean after application of sub-doses of glyphosate. Experiments were carried out in a greenhouse. The design used was a completely randomized design with 20 replications, in a 3 x 3 double factorial scheme (cultivars x treatments). Soybean cultivars one NR, RR and one cultivar RR2 were used, with application of glyphosate doses of 0, 11.25 and 22.5 g ae ha⁻¹ for the cultivar NR and 0, 45 and 90 g ae ha⁻¹ for cultivars RR and RR2. We identified 587 DEG present in several enriched pathways. Lignin catabolism pathways were observed, resulting in a reduction of its contents after glyphosate application. Soybean cultivars showed higher phosphorus concentration when applied with sub doses of glyphosate, although no pathways and genes related to this process were observed. Components of the shikimic acid pathway were affected with the application of glyphosate, and appear to be linked to several enriched pathways. For the three soybean cultivars, plant biomass was increased with the application of sub-doses of glyphosate.

Keywords rnaseq; *Glycine max* (L.) Merrill; hormesis; glyphosate stimulus.

2.1 INTRODUÇÃO

A soja destaca-se no cenário brasileiro como uma das culturas mais importantes ao país (APROSOJA, 2022). Uma das grandes preocupações do setor produtivo da soja é o aumento de produtividade, sem a necessidade de abertura de novas áreas ocupadas com vegetação nativa, assim estudos que melhoram técnicas e práticas que possibilitem esses incrementos e que não acarretem aumento dos custos de produção, são de extrema importância. Nesse cenário pode-se abordar o efeito de sub doses de glyphosate em soja, com possibilidade de incrementos de produtividade na soja. Porém esse mecanismo deve ser entendido para posterior uso a campo como recomendação na cultura.

Doses reduzidas de glyphosate tem sido reportada como estimuladoras para o crescimento de plantas, com efeito conhecido como Hormesis (BRITO et al., 2018, VELINI et al., 2008, DUKE et al., 2006). Uma das hipóteses para o efeito de hormesis do glyphosate é pela redução da enzima EPSPs disponível para a rota do ácido chiquímico, e como a lignina depende dessa rota, há redução dos seus níveis, de modo suficiente para particionar uma maior quantidade de carbono à produção de

sacarose, aumentando assim o crescimento da planta (VELINI et al., 2008, DUKE et al., 2006). Outra hipótese é que as subdoses de glyphosate podem estimular a absorção de fósforo pelas plantas (GODOY, 2007; PEREIRA et al., 2019). Porém não se sabe ao certo todos os mecanismos desencadeados na planta, uma vez que vários efeitos podem ser observados nas plantas afetados pelo efeito de hormesis de glyphosate (BRITO et al., 2018).

Na planta o glyphosate é translocado principalmente via simplasto, e se acumula em tecidos imaturos e meristemáticos, entretanto, significativo movimento apoplástico também ocorre. A movimentação do glyphosate do apoplasto para o simplasto, pode ser facilitada pelas proteínas de transporte de fosfato (DENIS e DELROT, 1993; MORIN et al. 1997; GODOY 2007; PEREIRA et al., 2019), uma vez que o grupo fosfato do glyphosate pode competir com o fósforo pelo transporte para dentro da célula, nos transportadores de fosfato (MERVOSH e BALKE, 1991; BRECKE e DUKE 1980). Quando as células sinalizam a falta de fósforo é desencadeado a expressão de genes de transportadores de fósforo altamente específicos (RUBIO et al., 2001; ROUACHED et al. 2010). Trabalhos com aplicação de sub doses de glyphosate tem demonstrado que plantas de soja e eucalipto absorvem mais fósforo que nas não tratadas (GODOY 2007; PEREIRA et al., 2019).

A enzima EPSPS, é uma importante enzima na rota do ácido chiquímico, a qual é responsável pela produção dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano (BENTLEY, 1990). Assim, a inibição da EPSPs pelo glyphosate, pode afetar não apenas a produção de proteínas da soja (BØHN et al., 2014, REDDY et al., 2004, DUKE et al., 2003), mas também a via dos fenilpropanóides e, conseqüentemente, a produção de lignina (ZOBIOLE et al., 2010). A rota dos fenilpropanóides e lignina podem representar até 35% da biomassa vegetal de uma planta (BOUDET et al., 1985). No citosol, a rota da lignina inicia-se com a enzima fenilalanina amônia liase (PAL), que desamina a fenilalanina em ácido t-cinâmico (BOERJEN et al., 2003). A lignina apresenta funções importantes na planta, dentre estas: sustentação (BOUDET 2000; BOUDET et al. 2003) e de favorecer um eficiente transporte de água e solutos a grandes distancias no interior do sistema vascular (BERNARDS et al. 2000). Porém, estudos tem demonstrado que a lignina, em maiores quantidades, reduz o crescimento das plantas, bem como o acúmulo de biomassa e produtividade (NOVAES et al., 2010, HUANG et al., 2010; HU et al., 1999).

Uma das formas de entender e elucidar os efeitos de sub doses do glyphosate em plantas, seria através do sequenciamento de transcriptomas (RNA-seq), comparando plantas tratadas com sub doses de glyphosate e plantas não tratadas, por exemplo usando a plataforma Illumina (MARDIS, 2008). Dados de transcriptomas completos das plantas de soja permitiriam definir quais são os genes de maior expressão na planta, englobando todas as possíveis hipóteses que elucidam o efeito de hormesis de glyphosate, bem como definir novos conceitos de atuação, gerando valiosa fonte de conhecimento e futuros estudos na área. Até o momento não foram gerados resultados desse nível de conhecimento, para o efeito de hormesis de glyphosate em plantas, demonstrando as infinitas possibilidades desta técnica. Após o sequenciamento dos transcriptomas é importante a validação dos dados pela técnica de RT-PCR, para gerar dados mais precisos (ZENONI et al., 2010).

Baseado nas informações encontradas na literatura, observa-se que o efeito de hormesis em plantas de soja não é completamente entendido e elucidado. As hipóteses levantadas nesse trabalho é que as plantas de soja aplicadas com subdoses de glyphosate podem ter os teores de lignina e fósforo afetados, além de outras hipóteses que poderão surgir com o uso das técnicas de sequenciamento de transcriptomas (RNA-seq) para elucidar quais genes estão envolvidos com o estímulo de crescimento na soja após a aplicação de sub doses de glyphosate. Assim, justifica-se novas pesquisas sobre esse tema, a fim de melhor elucidar o comportamento das plantas de soja com aplicação de sub doses de glyphosate, e gerar recomendações de uso do mesmo para esta finalidade, ressaltando que é possível aumento de produtividade com baixo custo a campo.

O objetivo do presente trabalho foi identificar as vias enriquecidas e genes expressos e se os mesmos estão relacionados com o teor de lignina, fósforo, taxa de transporte de elétrons, componentes da rota do ácido chiquímico e biomassa em soja após a aplicação de subdoses de glyphosate.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Características gerais dos experimentos

Foram realizados dois experimentos semelhantes, porém conduzidos em momentos distintos. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação no

Núcleo de Pesquisas avançadas em Matologia – Nupam, localizado na Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA, da Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’ Campus de Botucatu – SP. As condições proporcionadas pela casa de vegetação foram de temperaturas médias em torno de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar em 60 % e luz natural.

Para compor as unidades experimentais, foram utilizados vasos com capacidade de 2,8 litros, preenchidos com substrato Carolina® composto por turfa de esfagno, vermiculita e casca de arroz carbonizada, com pH 5,7 ($\pm 0,5$). Foram semeadas 5 sementes por vaso, e após a emergência, foi realizado um desbaste para que permanecessem duas plantas viáveis de soja, por vaso.

Os experimentos foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado com 20 repetições, em esquema de fatorial duplo 3 x 3 (cultivares x tratamentos). Foram utilizadas cultivares de soja não RR CD383 (NR), RR BMX Tornado e uma cultivar RR2 M5917 IPRO, com aplicação de doses de glyphosate sal de potássio de 0, 11,25 e 22,5 g e.a ha^{-1} para a cultivar NR e 0,45 e 90 g e.a ha^{-1} para as cultivares RR e RR2. As doses foram definidas a partir dos experimentos do capítulo 1. Os tratamentos foram aplicados quando as plantas de soja se apresentavam no estágio vegetativo de V3 (três trifólios totalmente expandidos). Para as aplicações foram utilizados um pulverizador, instalado em sala de aplicação fechada, com pressão advinda de ar comprimido, equipado com barra de aplicação contendo seis pontas XR 110.02, espaçadas entre si por 0,5 m e posicionadas a 0,5 m de altura em relação às plantas, com pressão constante de 2 bar e uma velocidade de deslocamento de 1 m s^{-1} , gerando um volume de calda de 200 l ha^{-1} .

Das 20 repetições, seis delas foram utilizadas para a coleta de amostras para realizar a parte de transcriptomas e expressão de genes. Cinco delas para realizar as análises de fósforo e lignina. Outras cinco repetições foram coletadas para avaliar os componentes da rota do ácido chiquímico. Essas coletas foram realizadas aos 10 DAA. As demais repetições foram analisadas quanto a fluxo de transporte de elétrons (ETR) aos 7, 14, 21 e 28 DAA. Também aos 28 DAA as plantas foram coletadas para avaliar a produção de biomassa.

2.2.2 Variáveis analisadas

2.2.2.1 Análise de Transcriptomas

Com as seis repetições coletadas, foram formadas duas repetições compostas por triplicata biológica, coletando-se todas as folhas da planta aos 10 DAA. As amostras foram coletadas e colocadas instantaneamente em nitrogênio líquido para posterior armazenagem a -80°C até a análise. Cada amostra e repetição foram processadas individualmente para a extração do RNA total.

Para extração de RNA total foi utilizado o método de Trizol Reagent (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA), seguindo os passos: (a) aproximadamente 300 mg de cada amostra foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido e acondicionados em tubos de 2 ml; (b) foi adicionado 1 ml de Trizol e as amostras foram homogeneizadas em vortex e, posteriormente, foram mantidas em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente; (c) transcorrida a incubação anterior, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm a 4°C por 15 minutos; (d) transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de 2 ml; (e) foram adicionados 200 µl de clorofórmio e as amostras foram homogeneizadas em vortex e permaneceram a temperatura ambiente por 3 minutos; (f) as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm a 4°C por 15 minutos; (g) transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de 2 ml e foram adicionados 500 µl de álcool isopropanol a uma concentração de 100 % a uma temperatura de -20°C, então misturou-se por imersão de tubo e imediatamente as amostras foram acondicionadas em freezer a -20 °C, por 30 minutos; (h) as amostras foram centrifugadas a 13200 rpm a 4°C por 30 minutos; (i) o sobrenadante foi removido e foi adicionado 1 ml de etanol 70 % (H₂O DEPC) para a lavagem do pellet; (j) as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm a 4°C por 5 minutos e descartado o sobrenadante; (k) o pellet foi submetido a secagem e ressuspensão em 20 µl de H₂O DEPC.

O RNA foi quantificado em espectrofotômetro modelo: Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer (Saveen 1 Werner, Malmo, Suécia) e para avaliar sua qualidade e integridade aproximadamente 1 µg de RNA foi verificado em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo e submetido a 120 V por 25 minutos. As amostras de RNA total verificadas foram tratadas com DNaseI-RNase free segundo as recomendações do fabricante (Promega Biosciences, Wisconsin, EUA), para eliminação de eventual contaminação com DNA genômico. Sua integridade foi garantida através da obtenção do RIN (RNA Integrity Number) maior 8 (Agilent 2100

Bioanalyzer; Agilent Technologies, Alemanha). Posteriormente, as amostras foram armazenadas a -80 °C.

Para construção das bibliotecas genômicas foram realizadas as comparações dentro dos tratamentos com a aplicação das subdoses de glyphosate, com a sua testemunha sem aplicação, dentro de cada cultivar estudada. Foram utilizados 1000 ng de RNA total para a análise de RNAseq. As amostras foram indexadas com adaptadores e submetidas a um sequenciamento de 2 X de 100 pares de bases, utilizando um instrumento HiSeq 2500 (Illumina, Estados Unidos). O sequenciamento foi realizado em 18 amostras de RNA em uma faixa da célula de fluxo, seguindo as instruções do fabricante. A saída de dados no formato de arquivo fastq, continha informações de sequência, incluindo a qualidade de sequenciamento (pontuação de qualidade phred). Foram utilizadas pontuações médias de phred ≥ 20 por posição para alinhamento. No entanto, de 18 amostras duas bibliotecas não se agruparam no sequenciador (RR GLY0 e RRGLY 45), sem gerar os dados de sequenciamento, por isso foram descartadas da análise e dos resultados, devido a impossibilidade de substituição.

2.2.2.2 ETR

O ETR foi avaliado aos 7, 14, 21 e 28 DAA com auxílio de um fluorômetro portátil (Multi-Mode Chlorophyll Fluorometer OS5p – Opti Sciences), com leituras realizadas em seis pontos da folha mais jovem totalmente expandida de cada tratamento e repetição.

2.2.2.3 Teor de lignina

Para avaliação do teor de lignina as plantas de soja foram secas em estufa de circulação forçada a 40°C até atingirem peso constante. Depois foram trituradas em moinho tipo Wiley e analisadas no laboratório de bromatologia, no Departamento de Zootecnia da UNESP/Botucatu. A técnica utilizada foi baseada no método da lignina em detergente ácido (LDA), em que a amostra foi previamente tratada com solução de detergente ácido, resultando na fibra em detergente ácido (FDA), a qual posteriormente foi submetida à digestão com solução concentrada de ácido sulfúrico a 72% (VAN SOEST, 1965). Esta técnica foi adaptada com a utilização de saquinhos

confeccionados em TNT 100 (porosidade de 100 micra). Após a digestão, os saquinhos foram colocados em autoclave (120°C por 30 min) e dispostos no interior de garrafão para solução de capacidade de 20 L, contendo 50 mL de solução em detergente ácido por amostra. Em seguida, receberam pré-lavagem com água fria para retirada do excesso de detergente, sendo submetidos a cinco enxágues com água destilada quente (5 min), a seguir as amostras foram escorridos e imersas em acetona (5 min) e secos em estufa (105°C). Posteriormente as amostras foram queimadas em mufla e então calculou-se os valores de lignina (porcentagem) em relação a massa seca inicial.

2.2.2.4 Teor de fósforo

As plantas coletadas para quantificação do teor de fósforo foram secas em estufa com circulação de ar forçado a 40°C até peso constante. Posteriormente foram trituradas em moinho tipo Wiley. O teor de fósforo foi determinado por digestão ácida conforme metodologia descrita por (TEDESCO et al., 1995) e determinado pelo método de colorimetria. A altura foi medida aos 7, 14, 21 e 28 DAA, com régua da medindo-se da superfície do solo até a inserção da última folha totalmente expandida. Aos 28 dias as plantas foram cortadas e armazenadas em sacos de papel e posteriormente levadas a estufa de circulação forçada de ar, em temperatura de 60°C, até peso constante. Posteriormente foram pesadas em balança com precisão de quatro dígitos.

2.2.2.5 Teor dos componentes da rota do ácido chiquímico

Após a coleta das cinco plantas para quantificação dos componentes da rota do ácido chiquímico as amostras foram mantidas na temperatura de -80°C, até o momento do processamento. Após isso as amostras foram maceradas com nitrogênio líquido, utilizando graal e pistilo e secas no vácuo. Pesou-se uma alíquota de 100 mg de cada amostra macerada, acondicionando-as em tubos falcon de 15 mL e posteriormente foram adicionados 10 mL da solução extratora de água acidificada a pH de 2,5. As amostras foram levadas ao banho de ultrassom por 30 minutos. Após centrifugação por 4.000 Rpm por 10 minutos, realizou-se a filtragem do sobrenadante das amostras através de filtros Millipore 0,2 µm, transferindo o conteúdo para vials (1,5 mL) e levando-as para análise em LC/MS/MS.

Para esta determinação dos componentes da rota do ácido chiquímico (teor interno do glyphosate, AMPA, ácido chiquímico, ácido cumárico, ácido benzóico e ácido salicílico, além dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano), foi utilizado o sistema LCMS/MS composto por um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC), Shimadzu, modelo Proeminence UFLC, que combina análise ultrarrápida e excelente performance de separação, com alta confiabilidade de resultados; equipado com duas bombas LC20AD, auto injetor SIL-20AC, degazeificador DGU-20A5, sistema controlador CBM20A (permite a operação totalmente automatizada) e forno CTO-20AC (para controle da temperatura da coluna). Acoplado ao HPLC está o espectrômetro de massas 4500 (Applied Biosystems) híbrido triplo quadrupolo. As análises cromatográficas foram conduzidas com uma coluna C18 (Phenomenex Gemini 5 μ C18RP 110Å) utilizando um volume de injeção de 20 μ L, com 5 mM de acetato de amônio em água (fase A) e 5 mM de acetato de amônio em metanol (fase B). O fluxo utilizado foi de 0,8 mLmin⁻¹, o modo gradiente iniciou com a proporção de 90:10 (água/metanol), passando para 5:95 aos 4 min e retornando à condição inicial aos 10 min, o tempo total de corrida foi de 15 min. Os cromatogramas gerados para cada composto estão nos apêndices A e B.

2.2.2.6 Massa da matéria seca

Aos 28 DAA as plantas foram coletadas e dispostas em sacos de papel devidamente identificados. As amostras coletadas foram colocadas em estufa de circulação de ar forçado a 60°C até peso constante. Posteriormente foram pesadas em balança analítica de precisão.

2.2.3 Análise dos dados

Os dados das leituras do RNA-seq foram mapeadas com genoma da soja usando TopHat2. As contagens para os genes RefSeq foram obtidas utilizando-se HTSeq com as configurações padrão, e o DESeq2 (versão 1.4) foi usado para normalizar a contagem de expressões. A variação do fold foi calculada como a razão de contagens normalizadas para cada amostra em relação à média do grupo de referência para cada genótipo. Os genes foram considerados diferencialmente expressos (DEG) se fold change (FC) ≥ 2 , e os valores $p \leq 0,05$. Para visualizar os genes DEG foi utilizada a análise de PCA e Heatmaps.

Os demais dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, posteriormente foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e quando significativos, foi realizado o teste de média T (LSD) ($p \leq 0,05$), foram realizados todos os desdobramentos necessários. Foi realizada análise conjunta para os experimentos em duplicata.

Para todos os dados, foi calculado o intervalo de confiança ($p=0,05$) da média (Equação 3) no software Microsoft Excel, o intervalo de confiança será adicionado as médias nos gráficos (média $\pm$ IC).

$$\text{Equação 3: } Ic = \frac{t * DP}{\sqrt{n}}$$

Onde, Ic = Intervalo de confiança, t = valor de t tabelado a 5%, DP = desvio padrão e $\sqrt{n}$ = raiz quadrada do número de repetições.

2.3 RESULTADOS

Foi analisado o transcriptomas das plantas de soja com e sem a aplicação foliar de glyphosate aos 10 dias após a aplicação. O alinhamento dos reads mapeados foi $\geq 90\%$ no genoma referência de *Glycine max* e, possibilitou verificar a expressão de 31515 genes. A análise de 31515 genes revelou 587 genes diferencialmente expressos (DEG) ($p \leq 0.05$ e fold change ≥ 2), nas plantas de soja dos quais 229 e 358 foram induzidos e reprimidos, respectivamente. A análise de componentes principais (PCA), demonstrou diferença de expressão de genes, entre os grupos das cultivares (NR, RR e RR2) e grupos de doses (0; 11,25; 22,5 e a ha⁻¹ para NR e 0; 45 e 90 e a ha⁻¹ para RR e RR2) de glyphosate, demonstrando que as cultivares respondem de maneira diferente a aplicação de glyphosate, por isso serão discutidas e analisadas separadamente, sempre comparando as doses de glyphosate em relação a testemunha sem aplicação (Figura 1AB e 2).

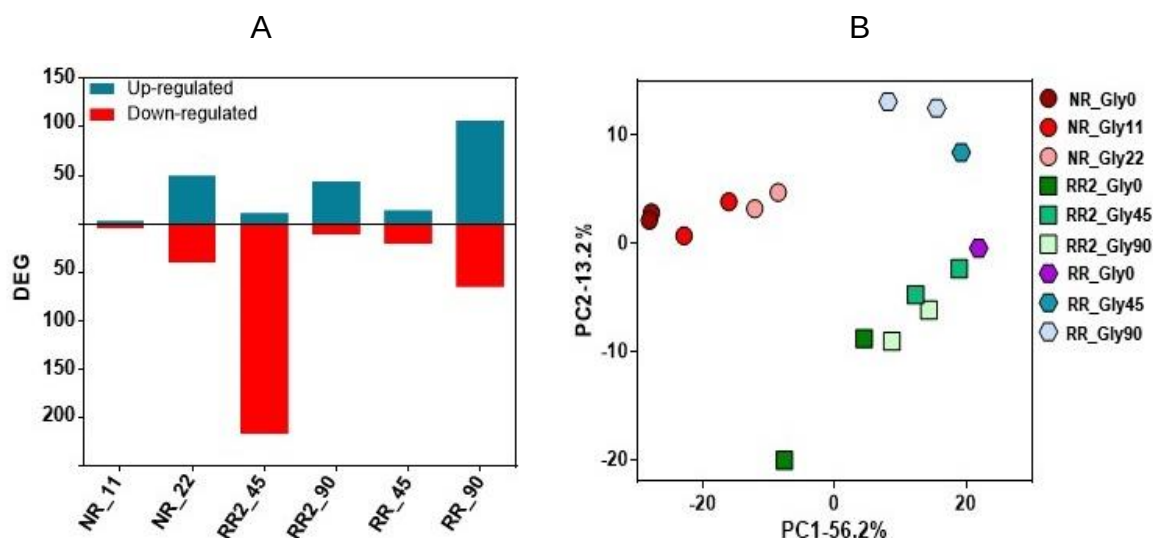


Figura 1. Genes diferencialmente expressos (DEG) e análise de PCA dos resultados da expressão de genes diferencial dos cultivares de soja NR CD383, RR BMX Tornado e RR2 M5917, 10 dias após a aplicação de subdoses (11,25 e 22,5 g e.a ha⁻¹ para a cultivar NR e 45 e 90 g e.a ha⁻¹ para as cultivares RR e RR2) de glyphosate via aplicação foliar.

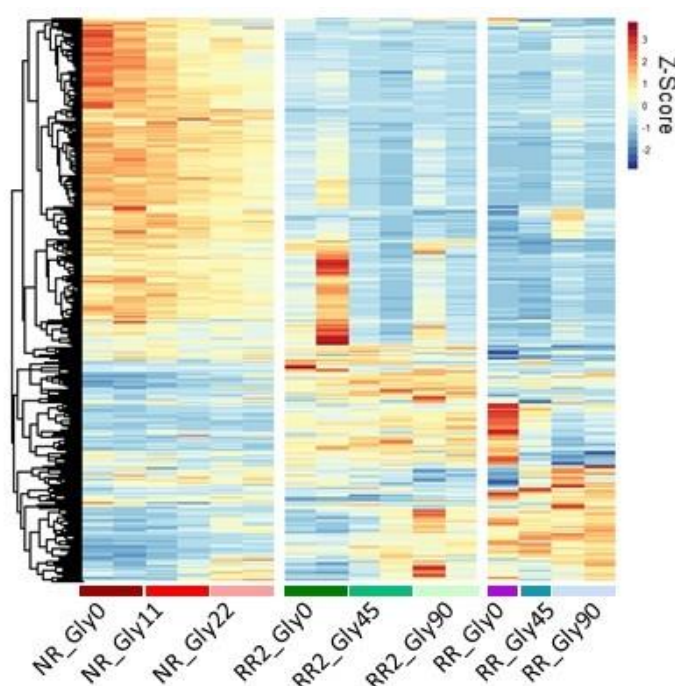


Figura 2. Heatmap de genes diferencialmente expressos (DEG) dos cultivares de soja NR CD383, RR BMX Tornado e RR2 M5917, 10 dias após a aplicação de subdoses (11,25 e 22,5 g e.a ha⁻¹ para a cultivar NR e 45 e 90 g e.a ha⁻¹ para as cultivares RR e RR2) de glyphosate via aplicação foliar.

A análise de enriquecimento de GO processo biológico completo dos DEG, revelou que as vias mais enriquecidas das doses de glyphosate em relação a testemunha para a cultivar NR foram: nos processos metabólicos de flavonas, UDP-Rhamnose e glucuronate, glicosaminoglicano, triglicerídeos e ácido jasmônico, além de genes envolvidos no desenvolvimento meristemático e na regulação da sinalização da auxina. Dentre as vias mais enriquecidas podemos observar vias presentes na rota do ácido chiquímico como nos processos metabólicos de flavonas e na regulação da sinalização da auxina. Na via de metabólicos de flavonas dos 10 genes identificados um gene foi DEG, o qual enriqueceu a via em 99,72, o gene DEG foi o *LOC100810341*, as flavonas são produzidas através do aminoácido fenilalanina que pode ser afetada pela aplicação de subdoses de glyphosate. Na via de regulação da sinalização de auxina dos 31 genes observados um deles foi DEG foi o *AUX22* e enriqueceu a via em 32,17. Outras vias enriquecidas não estão diretamente relacionadas a rota do ácido chiquímico na qual o glyphosate apresenta os principais efeitos (Figura 3; Apêndice C).

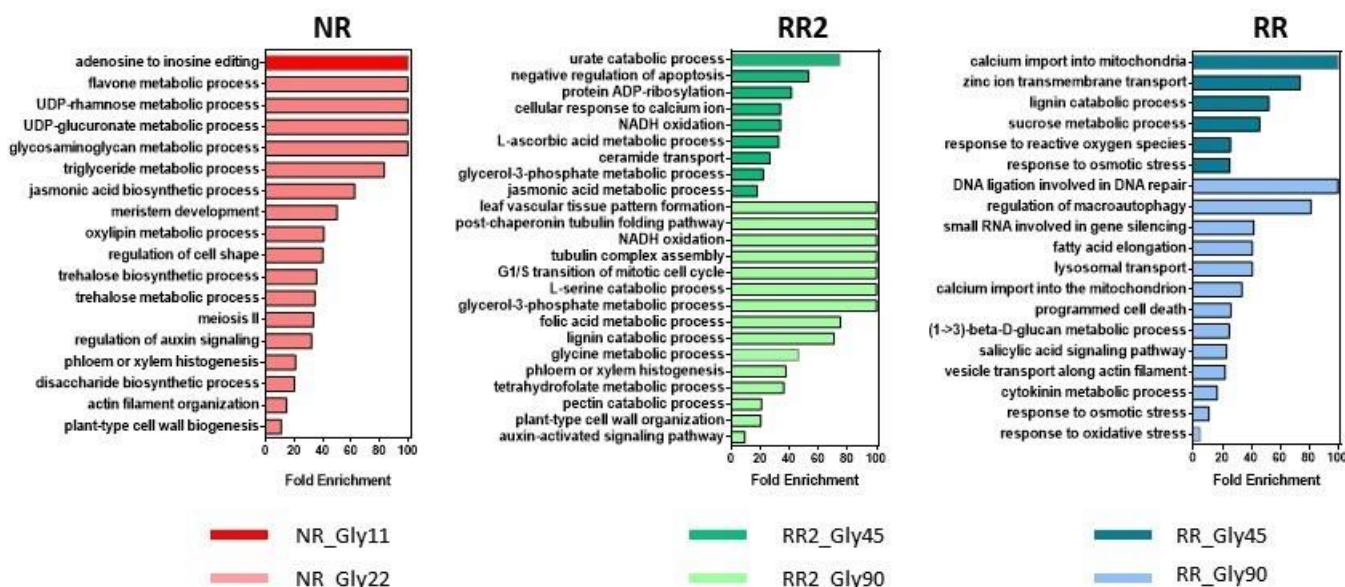


Figura 3. Enriquecimento de GO de processo biológico completo dos DEG dos cultivares de soja NR CD383, RR BMX Tornado e RR2 M5917, 10 dias após a aplicação de subdoses (11,25 e 22,5 g e.a ha⁻¹ para a cultivar NR e 45 e 90 g e.a ha⁻¹ para as cultivares RR e RR2) de glyphosate via aplicação foliar.

Na cultivar RR as rotas com maior número de genes expressos após a aplicação de glyphosate em relação a testemunha sem aplicação foram: transporte de cálcio e zinco, catabolismo de lignina, reposta a estresses oxidativos e osmóticos,

elongação de ácidos graxos de cadeia longa, DNA ligase, no processo de metabolismo da sucrose e na regulação da sinalização do ácido salicílico. A via do catabolismo de lignina, apresenta a maior afinidade com a rota do ácido chiquímico e com o glyphosate, do total de 51 genes envolvidos nessa via, o gene LOC100806093 foi DEG e enriqueceu a via em 52,12. Outra via enriquecida foi a da regulação da sinalização do ácido salicílico, na rota do ácido chiquímico o ácido salicílico pode ser produzido através da fenilalanina e do corismato e o glyphosate pode afetar seus teores, nos resultados apresentados no primeiro relatório as doses de glyphosate aplicadas nas plantas do cultivar de soja RR incrementaram os teores do ácido salicílico, provavelmente devido ao enriquecimento de 22,79 com DEG do gene LOC100786006. Vale destacar que outras vias foram enriquecidas e que ajudam a interpretar alguns resultados como o maior teor de cálcio no tecido foliar da soja tratada com subdoses de glyphosate, a via de transporte de cálcio foi enriquecida em 100 vezes na dose de 45 g e.a ha⁻¹ e 33,52 na dose de 90 g e.a ha⁻¹ com DEG de LOC100814253. Outra via com importância para a soja é a dos ácidos graxos, no qual duas vias foram enriquecidas a da elongação dos ácidos graxos com o DEG LOC100806377 com enriquecimento de 40,7 e também a via dos ácidos graxos de cadeia longa com o DEG LOC100817853 e com enriquecimento de 23,73 (Figura 3; Apêndice D).

Para a Cultivar RR2 foram observadas maior número de genes para as seguintes rotas metabólicas das doses de glyphosate (45 e 90 g e.a ha⁻¹) em relação a testemunha: catabolismo de lignina, resposta celular ao cálcio, formação de tecido vascular nas folhas, oxidação de NADH, metabolismo do glicerol e glicina e atividade da auxina. Das vias mais enriquecidas, podemos observar a presença de duas vias importantes na rota do ácido chiquímico e que apresenta relação com a aplicação de glyphosate. A primeira é a rota de catabolismo de lignina que apresentou enriquecimento de 70,25 e do total de 51 genes encontrados para essa rota os genes LOC100806093 e LOC100785427 foram DEG. A presença da expressão desses genes de catabolismo de lignina nas doses de glyphosate em relação a testemunha, confirma os dados apresentados acima, de redução dos teores de lignina nas plantas de soja da cultivar RR2, quando aplicadas as doses de glyphosate. A segunda via de importância na rota do ácido chiquímico encontrada nos genes expressos foi a regulação da sinalização de auxina que apresentou enriquecimento de 9,76 e do total de 590 genes identificados, os genes LOC100784373, LOC100813003 e

LOC100805743 foram DEG em relação a testemunha sem aplicação de glyphosate (Figura 3, Apêndice D).

Quanto aos valores de ETR, observou-se que para a cultivar NR as doses de glyphosate 11,25 e 22,5 g e.a ha⁻¹ proporcionaram maiores valores de ETR em relação a testemunha nas avaliações realizadas aos 7, 14 e 21DAA. Aos 28DAA os teores de ETR foram semelhantes entre os tratamentos (Figura 4A). Para a cultivar RR, não foram observadas diferenças entre os tratamentos com aplicação de glyphosate e a testemunha sem aplicação (Figura 4B). Para a cultivar de soja RR2 as doses 45 e 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate proporcionaram maiores valores de ETR em relação a testemunha sem aplicação aos 7DAA, nas demais avaliações não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 4C).

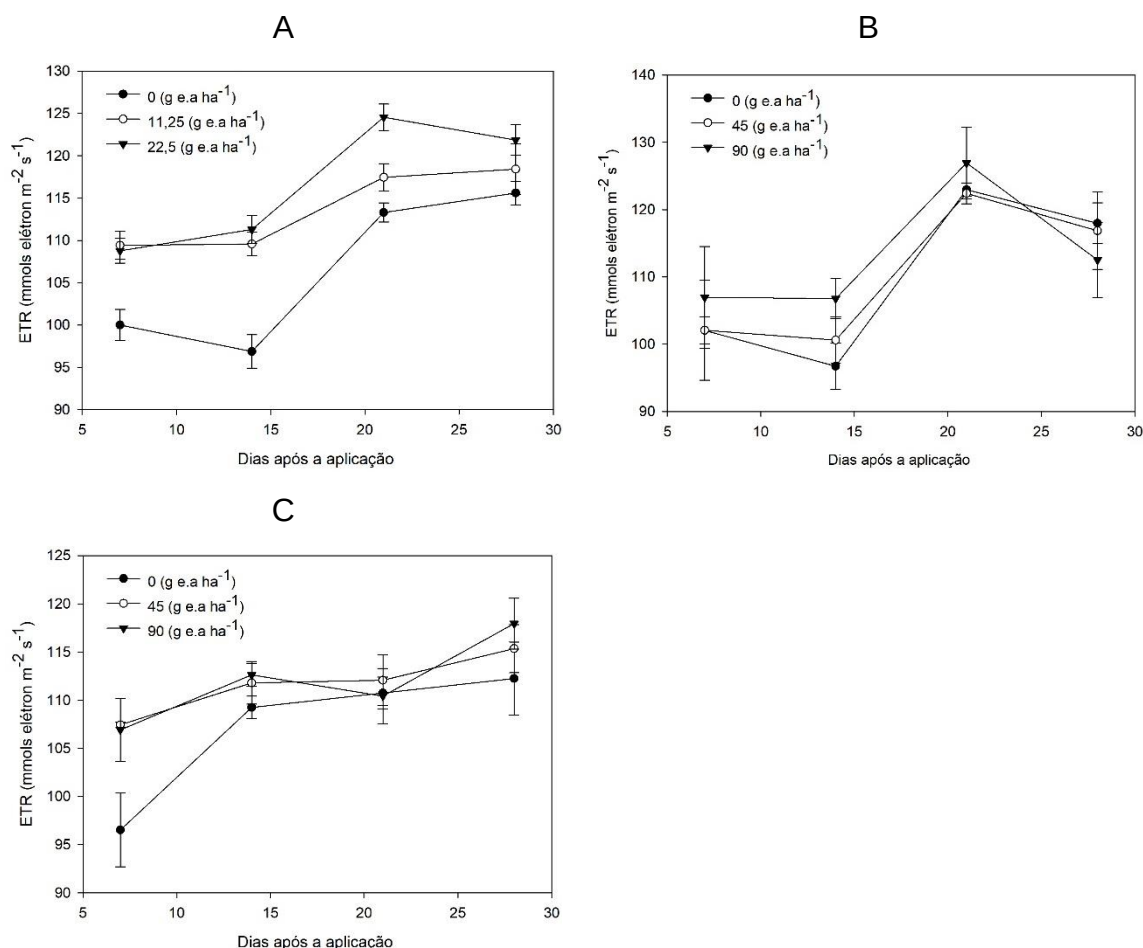


Figura 4. Taxa de transporte de elétrons (ETR) do cultivar de soja NR CD383 (A), RR BMX Tornado (B) e RR2 M5917 (C), após a aplicação de subdoses (11,25 e 22,5 g e.a ha⁻¹ para a cultivar NR e 45 e 90 g e.a ha⁻¹ para as cultivares RR e RR2) de glyphosate via aplicação foliar, aos 7, 14, 21 e 28 DAA. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade).

Em relação a porcentagem de lignina, observou-se que para as cultivares testadas a aplicação de glyphosate reduziu a porcentagem de lignina nas plantas de soja em relação a testemunha sem aplicação de glyphosate, diferindo significativamente pelo teste T (Figura 5A). Para a cultivar NR a dose 22,5 g e.a ha⁻¹ de glyphosate promoveu maior teor de fósforo, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Em relação a testemunha a dose 22,5 g e.a ha⁻¹ de glyphosate incrementou em 28% o teor de fósforo. A dose de 11,25 g e.a ha⁻¹ de glyphosate também diferiu significativamente da testemunha sem aplicação, apresentando incremento de 16% no teor de fósforo em relação a testemunha. Para a cultivar RR as doses de glyphosate diferiram significativamente da testemunha incrementando o teor de fósforo em 24-35% em relação a mesma. Na cultivar RR2 a dose 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate apresentou maior teor de fósforo diferindo significativamente dos demais tratamentos, em relação a testemunha a dose 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate incrementou em 32% o teor de fósforo. A dose de 45 g e.a ha⁻¹ de glyphosate também diferiu significativamente da testemunha sem aplicação, promovendo incremento de 20% em relação a testemunha sem aplicação (Figura 5B).

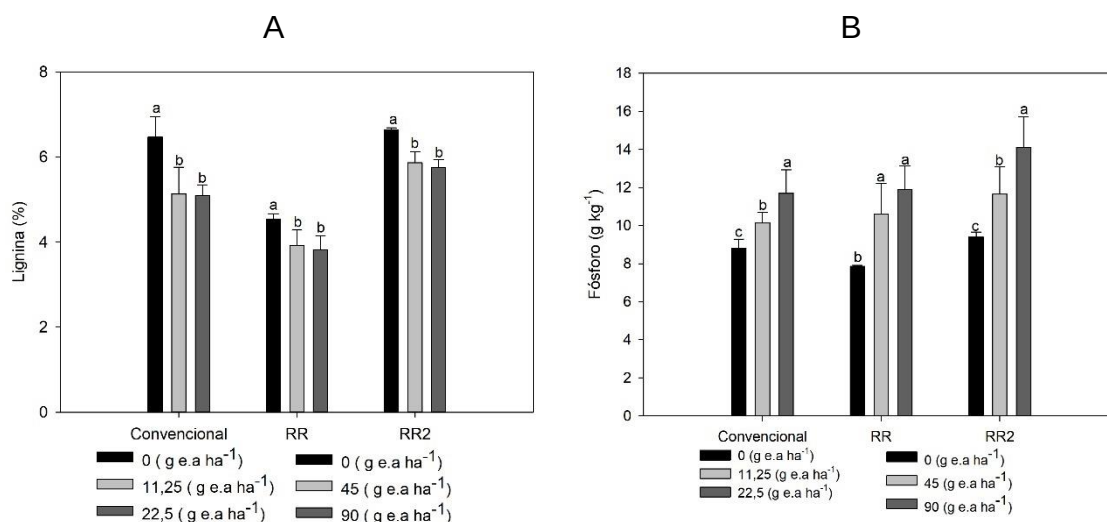
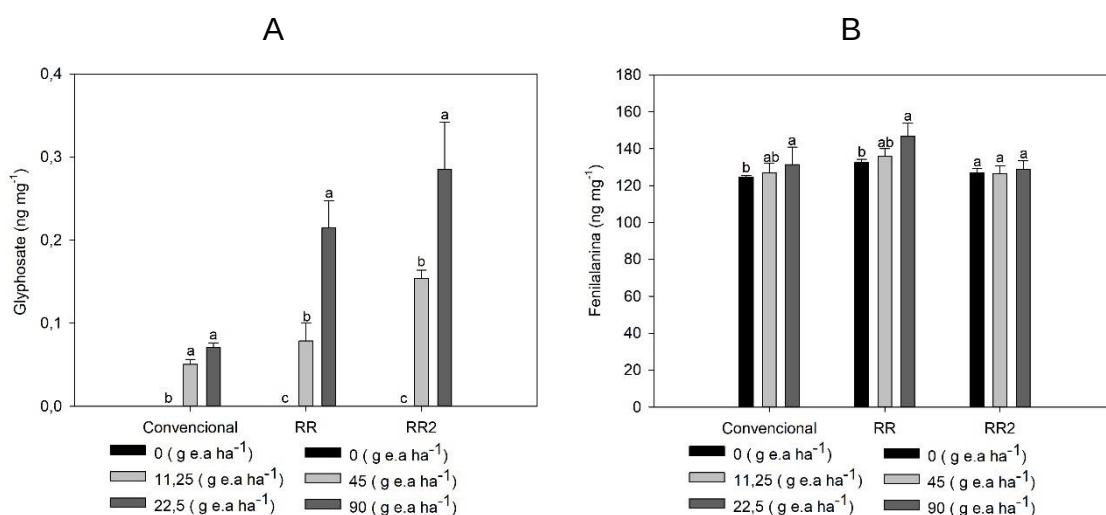


Figura 5. Porcentagem de lignina (A) e teor de fósforo dos cultivares de soja NR CD383, RR BMX Tornado e RR2 M5917, 10 dias após a aplicação de subdoses (11,25 e 22,5 g e.a ha⁻¹ para a cultivar NR e 45 e 90 g e.a ha⁻¹ para as cultivares RR e RR2) de glyphosate via aplicação foliar. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade).

Quanto aos teores de glyphosate nas plantas de soja, observou-se que em ambas as cultivares os teores de glyphosate foram proporcionais conforme a doses aplica, assim as doses maiores apresentaram maior concentração de glyphosate dentro da planta (Figura 6A), apesar da presença de glyphosate não foram encontrados teores de AMPA (Dados não apresentados). Os teores do aminoácido fenilalanina apresentaram incremento nos cultivares NR e RR quando o glyphosate foi aplicado nas doses 22,5 (NR) e 90 g e.a ha⁻¹, diferindo significativamente da testemunha sem aplicação. Para a cultivar RR2 não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para o teor de fenilalanina (Figura 6B). Na cultivar NR o teor de tirosina foi maior para as doses de glyphosate aplicadas, diferindo significativamente da testemunha sem aplicação. Já para a cultivar RR2 a dose 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate reduziu o teor de tirosina em relação aos demais tratamentos. Na cultivar RR não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 6C). O teor de triptofano na cultivar NR foi reduzido com a aplicação das doses de glyphosate, diferindo significativamente da testemunha sem aplicação, o mesmo acontecendo para a cultivar RR2 somente na maior dose aplicada (90 g e.a ha⁻¹). Já para a cultivar RR a dose 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate apresentou maior teor de triptofano, diferindo significativamente em relação aos demais tratamentos (Figura 6D).



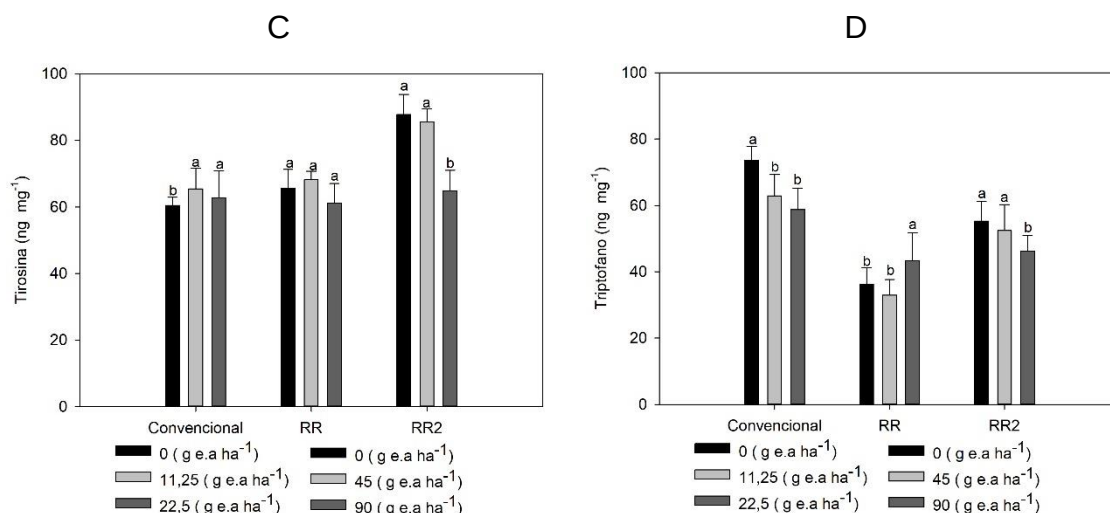


Figura 6. Teor de glyphosate (A), fenilalanina (B), tirosina (C) e triptofano (D) dos cultivares de soja NR CD383, RR BMX Tornado e RR2 M5917, 10 dias após a aplicação de subdoses (11,25 e 22,5 g e.a ha⁻¹ para a cultivar NR e 45 e 90 g e.a ha⁻¹ para as cultivares RR e RR2) de glyphosate via aplicação foliar. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade).

O glyphosate aplicado na dose de 11,25 e 22,5 g e.a ha⁻¹ na cultivar NR proporcionaram maior acúmulo do ácido chiquímico em relação a testemunha sem aplicação. Para a cultivar RR não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos aplicados em relação ao teor de ácido chiquímico. Na cultivar RR2 a dose 45 g e.a ha⁻¹ de glyphosate proporcionou maior acúmulo de biomassa em relação aos demais tratamentos (Figura 7A). Em relação ao ácido cumárico observou-se maior teor para a cultivar NR na dose 11,25 g e.a ha⁻¹ de glyphosate em relação aos demais tratamentos. O glyphosate aplicado na dose de 90 g e.a ha⁻¹ apresentou maior teor de ácido cumárico em relação aos demais tratamentos na cultivar RR. As doses 45 e 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate apresentaram maior teor de ácido cumárico, diferindo significativamente da testemunha sem aplicação (Figura 7B).

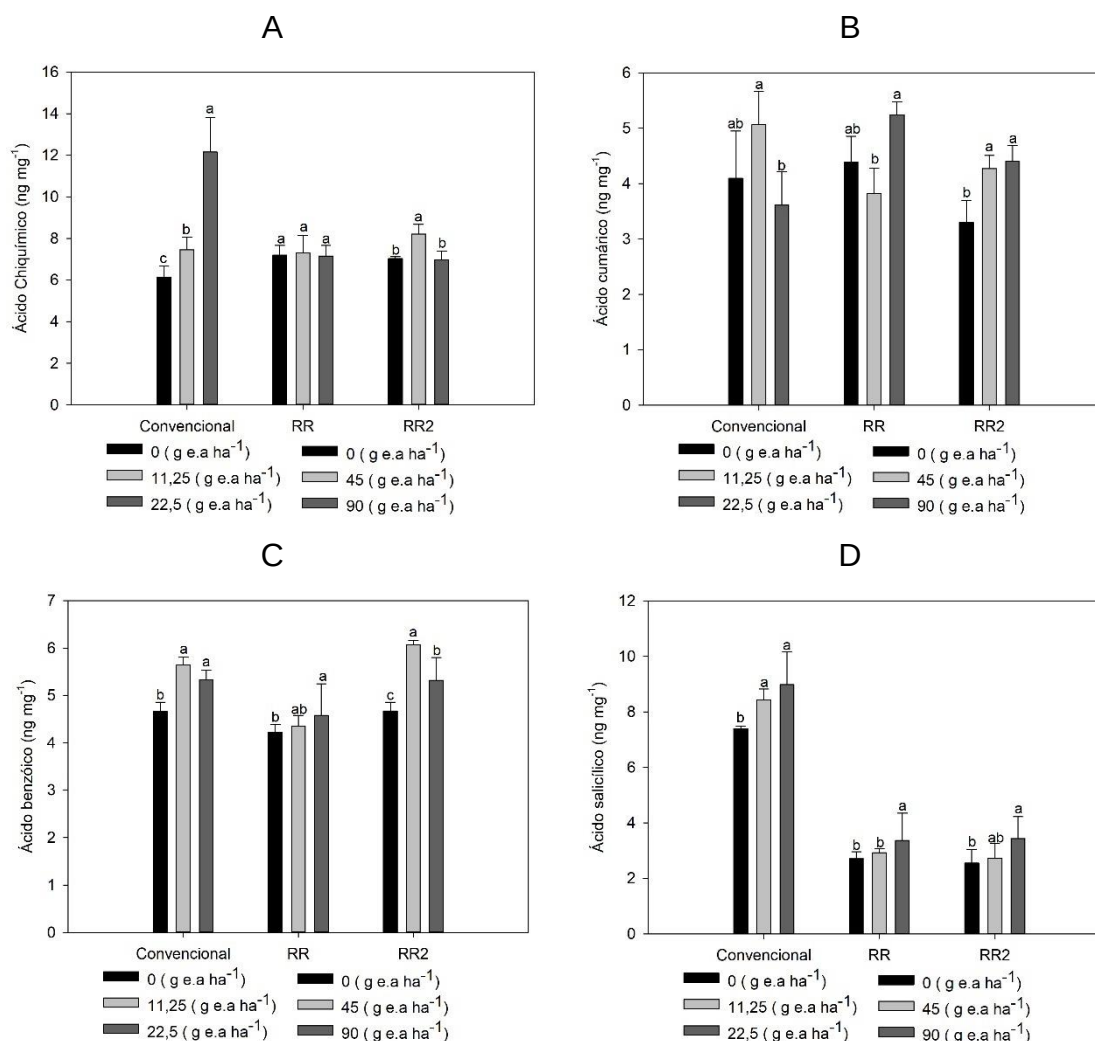


Figura 7. Teor de ácido chiquímico (A), ácido cumárico (B), ácido benzóico (C) e ácido salicílico (D) dos cultivares de soja NR CD383, RR BMX Tornado e RR2 M5917, 10 dias após a aplicação de subdoses (11,25 e 22,5 g e.a ha⁻¹ para a cultivar NR e 45 e 90 g e.a ha⁻¹ para as cultivares RR e RR2) de glyphosate via aplicação foliar. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade).

O teor do ácido benzóico foi incrementado pelas doses de glyphosate na cultivar NR em relação a testemunha sem aplicação. Na cultivar RR a dose 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate proporcionou maior teor de ácido benzóico em relação a testemunha sem aplicação. As doses de glyphosate aplicadas nas plantas de soja da cultivar RR2 proporcionaram maior teor de ácido benzóico em relação a testemunha sem aplicação (Figura 7C). Os teores de ácido salicílico na cultivar NR foram maiores com a aplicação das doses de glyphosate, diferindo significativamente da testemunha sem aplicação. Para as cultivares RR e RR2 a dose 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate

promoveu maior teor de ácido salicílico, em relação aos demais tratamentos (Figura 7D).

A massa seca das plantas de soja foi afetada pelos tratamentos com a aplicação de glyphosate. Para a cultivar NR a dose de 22,5 g e.a ha⁻¹ apresentou maior produção de biomassa em relação aos demais tratamentos, em relação a testemunha essa dose promoveu incremento de 22%. A dose de glyphosate de 11,25 g e.a ha⁻¹ também apresentou incremento de 10% de biomassa em relação a testemunha sem aplicação, diferindo significativamente. Para a cultivar RR observou-se que as doses 45 e 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate apresentaram maior massa em relação a testemunha sem aplicação, proporcionando incremento 8% em relação a testemunha sem aplicação. Resultado semelhante ao da cultivar RR foi encontrado também para a cultivar RR2, no qual as doses de 45 e 90 g e.a ha⁻¹ proporcionaram incremento de 18% em relação a testemunha sem aplicação (Figura 8).

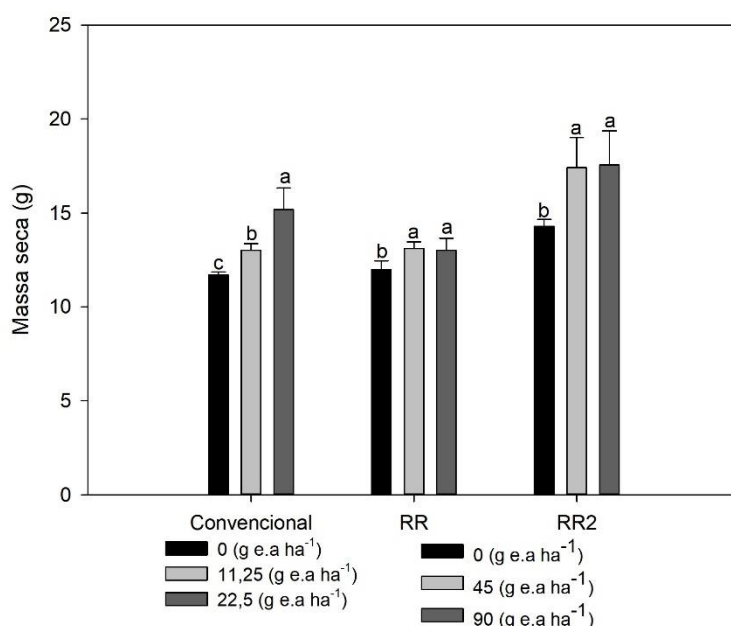


Figura 8. Massa de matéria seca dos cultivares de soja NR CD383, RR BMX Tornado e RR2 M5917, 28 dias após a aplicação de subdoses (11,25 e 22,5 g e.a ha⁻¹ para a cultivar NR e 45 e 90 g e.a ha⁻¹ para as cultivares RR e RR2) de glyphosate via aplicação foliar. Média ± intervalo de confiança (5% de probabilidade).

2.4 DISCUSSÃO

Os maiores valores de ETR principalmente para a cultivar NR e RR2, demonstram que os parâmetros fotossintéticos podem ser alterados e auxiliar no

processo de maior produção de biomassa, como evidenciado nesse trabalho. Em trabalho realizado por SILVA et al., (2016) as doses no intervalo de 1.8 a 36 g e.a ha⁻¹ de glyphosate incrementaram os valores de ETR em relação a testemunha sem aplicação em uma cultivar de soja NR. Em outros trabalhos com plantas de cevada, cana-de-açúcar e eucalipto foram encontradas incrementos na taxa de fotossíntese com aplicação de subdoses de glyphosate (NASCENTES et al., 2018; CEDERGREEN e OLESEN, 2010).

Os teores de lignina foram reduzidos pela aplicação das doses de glyphosate independente da cultivar de soja estudada. O glyphosate pode diminuir a produção de lignina, reduzindo os teores de fenilalanina, que é o principal substrato para sua produção (BOERJEN et al. 2003; ZOBIOLE et al., 2010). Porém a redução nos teores de fenilalanina pode ter acontecido anteriormente aos 10DAA, uma vez que os valores desse aminoácido foram incrementados pela aplicação de glyphosate nessa data (Figura 6B). Além disso, para as cultivares RR e RR2 foram observados genes relacionados a via de catabolismo de lignina o que explica a redução dos seus teores nessas cultivares (Figura 3A), porém para a cultivar NR as doses de glyphosate não influenciaram a via de lignina, mesmo com a redução da porcentagem de lignina encontradas nas plantas. A redução dos teores de lignina, pode ser suficiente para particionar uma maior quantidade de carbono à produção de sacarose, aumentando assim o crescimento da planta (DUKE et al., 2006; VELINI et al., 2008).

Embora não tenha sido observados genes ou vias relacionadas a absorção de fósforo (Figura 3), foram observados incrementos dos seus teores nas plantas de soja aplicadas com sub doses de glyphosate (Figura 5B), provavelmente não foram encontrados genes relacionados pois o estímulo na absorção de fósforo pode ter ocorrido antes da data de coleta. O incremento dos teores de fósforo pode ocorrer devido a competição do grupo fosfato do glyphosate com o fósforo pelo transporte para dentro da célula (BRECKE e DUKE, 1980; MERVOSH e BALKE, 1991). Quando a célula sinaliza falta de fósforo são expressos genes de transportadores de fósforo altamente específicos (RUBIO et al., 2001; ROUACHED et al., 2010; PEREIRA et al., 2019), elevando os níveis de fósforo dentro da planta. Porém em teste com deficiência de fósforo não foram encontradas respostas positivas de hormesis de glyphosate quando comparado a uma testemunha com teor alto de fósforo (CEDERGREEN et al., 2016), isso fortalece a hipótese de que a dinâmica do fósforo na planta pode ser um dos vários processos incrementados na hormesis. E sua presença no solo ou

substrato pode determinar a presença ou ausência da estímulo nas plantas aplicadas com glyphosate.

A resposta dos teores de aminoácidos para a aplicação das subdoses de glyphosate foi variável conforme a cultivares de soja testada. Foram observados alguns incrementos de fenilalanina na soja NR e RR, tirosina na soja NR e triptofano na soja RR, este estímulo pode estar relacionado a uma resposta fisiológica ao estresse provocado pelo glyphosate (DUKE et al., 2006), uma vez que a rota da EPSPs foi paralisada pela aplicação do glyphosate, devido ao acúmulo de ácido chiquímico na cultivar NR (Figura 4A) (SINGH e SHANER, 1998; HERNANDEZ et al., 1999; PLINE et al., 2002; REDDY et al., 2010). Outra explicação para o aumento no teor desses aminoácidos pode estar relacionada com a degradação de proteínas nas plantas e liberação de aminoácidos que a compõem (WANG, 2001; PETERSEN et al., 2007; GRAVENA et al., 2009; ORCARAY et al., 2010). Já o decréscimo em tirosina na cultivar RR2 e triptofano nas cultivares de soja NR e RR2, também pode estar relacionado a uma resposta fisiológica de estímulo uma vez que, esses aminoácidos podem estar sendo rapidamente utilizados para alguns processos dentro das plantas. Esses aminoácidos dão origem a diversos compostos envolvidos na regulação do crescimento ou na defesa de plantas, destacando-se os taninos condensados, antocianinas, vitamina E, ácido indolacético (IAA), ácido salicílico, flavonas, isoflavonas, fenilpropanóides e cumarinas, fundamentais para o crescimento e desenvolvimento vegetal (VELINI et al., 2012), e consequentemente podem auxiliar a enriquecer as vias enriquecidas encontradas por RNASeq (Figura 3).

Incrementos de ácido chiquímico nas plantas de soja NR, demonstram a paralização da enzima EPEPs e efeito do glyphosate nas plantas (HARRING et al., 1998). Segundo REDDY et al., (2008), em espécies sensíveis ao glyphosate o acúmulo de ácido chiquímico pode ser 300 vezes maior que em plantas resistentes ao glyphosate. Nesse trabalho a diferença das doses não permite comparação, mas fica claro que praticamente não há acúmulo de ácido chiquímico nas cultivares RR e RR2. Maiores concentrações de ácido cumárico e benzóico podem auxiliar as plantas de soja a recuperação de estresses oxidativos provocados as plantas, o que foi evidencia nas vias enriquecidas na cultivar RR no RNASeq (HARBORNE, 1973; BELITZ e GROSCH, 1988; DURAN e PADILLA, 1993; WANASUNDARA et al., 1994). Já o ácido salicílico está envolvido com o acionamento de genes de resistência a patógenos (WARD et al., 1991; RYALS et al., 1996; POPOVA et al., 1997; BUCHANAN et al.,

2000; RUUHOLA e JULKINEN-TITTO, 2003; SHAH, 2003). Assim a presença desses ácidos nas plantas de soja pode proporcionar maior habilidade de desenvolvimento no meio onde se encontram, podendo a aplicação de subdoses de glyphosate ser utilizada nesse sentido.

O incremento de biomassa nas cultivares de soja NR, RR e RR2, tem influência pelas variáveis alteradas após aplicação das subdoses de glyphosate. Dentre elas a interação das vias e genes enriquecidos, pela redução dos teores de lignina, incremento dos teores de fósforo, aumento do fluxo de elétrons, incremento de alguns aminoácidos essenciais e em relação aos incrementos dos ácidos cumárico, benzóico e salicílico (Figuras 4-8). Assim o efeito de estímulo das subdoses de glyphosate em soja NR, RR e RR2, acontece devido a interação de diversas características, que atuam em conjunto. Diante disso é difícil descrever o efeito de estímulo acontecendo apenas por uma característica isolada, demonstrando que esse efeito é complexo, de difícil entendimento e pode ocorrer de maneira diferente entre as espécies e mesmo dentro de cultivares da mesma espécie (BELZ e DUKE, 2014; BELZ et al., 2011; VELINI et al., 2008; DUKE et al., 2006). A maior massa seca das plantas de soja aplicadas com glyphosate em relação a testemunha nas cultivares RR e RR2 pode estar relacionada com o enriquecimento da via de regulação da sinalização de auxina e do catabolismo de lignina e assim aumentar o crescimento bem como o acúmulo de biomassa. Porém a soma do enriquecimento das demais vias também pode influenciar positivamente o crescimento das plantas de soja aplicadas com sub doses de glyphosate e com isso diferir significativamente da testemunha sem aplicação (Figura 3).

2.5 CONCLUSÕES

Algumas vias enriquecidas e alguns genes DEG, estão diretamente relacionadas a rota do ácido chiquímico como na redução dos teores de lignina e incremento de produção de biomassa após a aplicação de sub doses de glyphosate. Não foram observados genes e vias enriquecidas em relação a maior absorção de fósforo e ETR. O incremento de crescimento e acúmulo de biomassa ocasionadas pelas sub doses de glyphosate nas plantas de soja está ligado a interação de diversas vias biológicas e processos metabólicos.

2.6 REFERÊNCIAS

Anders S e Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology* 11: 106-111 (2010).

Aprosoja. Utilização da soja no Brasil. Disponível em: <http://www.aprosoja.com.br/>. Acessado em: 17/02/2022.

Belitz HD e Grosch W. *Química de los alimentos*. Zaragoza: Acribia 645- 656 (1988).

Belz RG e Duke SO. Herbicides and plant hormones. *Pest manag. Scie.* 70: 698-707 (2014).

Belz RG, Cedergreen N e Duke SO. Herbicide hormones—can it be useful in crop production? *Weed Research* 51: 321-332 (2011).

Bentley R. The shikimate pathway – a metabolic tree with many branches. *Crit. Rev. in Biochem. and Mol.ecular Biol.* 25: 307-384 (1990).

Bernards MA, Susag LM, Bedgar DL, Anterola AM e Lewis NG. Induced phenylpropanoid metabolism during suberization and lignification: a comparative analysis. *Jour. of plant physiol.* 157: 601-607 (2000).

Boerjen W, Ralph J, Baucher M. Lignin Biosynthesis. *Annual Revue Plants Biology* 54: 519-546 (2003).

Bøhn T, Cuhra M, Traavik T, Sanden M, Fagan J e Primicerio R. Compositional differences in soybeans on the market: glyphosate accumulates in Roundup Ready GM soybeans. *Food chemistry* 153: 207-215 (2014).

Boudet AM. Lignins and lignification: selected issues. *Plant Physiol. and Biochem.* 38: 81-96 (2000).

Boudet AM, Kajita S, Grima-Pettenati J e Goffner D. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends in plant science* 8: 576-581 (2003).

Boudet AM, Graziana A e Ranjeva R. Recent advances in the regulation of the prearomatic pathway. In: Van Sumere, C.F., Lea, P.J. (Eds.), *Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*. Clarendon Press, Oxford, 135–159 (1985).

Bray NL, Pimentel H, Melsted P e Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature biotechnology* 34: 525-531 (2016).

Brecke BJ e Duke WB. Effect of glyphosate on intact bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) and isolated cells. *Plant Physiology* 66: 656-659 (1980).

- Brito IP, Tropaldi L, Carbonari CA e Velini, E. D. Hormetic effects of glyphosate on plants. *Pest Manag. Scie.* 74: 1064-1070 (2018).
- Buchanan BB, Gruissem W e Jones RL. Biochemistry and molecular biology of plants. 3ed., Rockville: *American Society of Plant Physiologists* 1367 (2000).
- Cedergreen N. e Olesen CF. Can glyphosate stimulate photosynthesis? *Pestic. Biochem. and Physiol.* 96: 140-148 (2010).
- Cedergreen N, Hansen NK e Arentoft BW. The influence of nitrogen and phosphorous status on glyphosate hormesis in *Lemna minor* and *Hordeum vulgare*. *European journal of Agronomy* 73: 107-117 (2016).
- Denis MH e Delrot S. Carrier-mediated uptake of glyphosate in broad bean (*Vicia faba*) via a phosphate transporter. *Physiologia Plantarum* 87:569–575 (1993).
- Duke SO, Cedergreen N, Velini ED e Belz RG. Hormesis: is it an important factor in herbicide use and allelopathy? *Outlooks on Pest Managem.* 17: 29-33 (2006).
- Duke SO, Rimando AM, Pace PF, Reddy KN e Smeda RJ. Isoflavone, glyphosate, and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *Jour. of Agricult. and Food Chem.* 51: 340-344 (2003).
- Duran RM, e Padilla RB. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Grasas y Aceites* 44:101-106 (1993).
- Godoy MC. Efeitos do glyphosate sobre o crescimento e absorção de fósforo em soja. (2007). 43p. Dissertação (Mestrado em Agricultura). Faculdade de Ciências agrônômicas, Unesp, Botucatu – SP.
- Gravena R, Victoria Filho R, Alves PLC, Mazzafera P e Gravena AR. Low glyphosate rates do not affect *Citrus limonia* (L.) Osbeck seedlings. *Pest Managem. Scie.* 65: 420-425 (2009).
- Harborne JB. *Phytochemical Methods*. London: Chapman and Hall, 33-88 (1973).
- Harring T, Streibig JC e Husted S. Accumulation of shikimic acid: A technique for screening glyphosate efficiency. *Jour. of Agricult. and Food Chem.* 46: 4406-4412 (1998).
- Hernandez A, García-Plazaola JI e Becerril JM. Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Jour. of Agricult. and Food Chem.* 47: 2920-2925 (1999).
- Hu WJ, Harding SA, Lung J, Popko JL, Ralph J, Stokke DD, Chiang VL. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nature biotechnology* 17: 808-814 (1999).

Huang J, Gu M, Lai Z, Fan B, Shi K, Zhou YH e Chen Z. Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology* 153: 1526-1538 (2010).

Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9: 387-402 (2008).

Mervosh TL, Balke NE. Effects of calcium, magnesium, and phosphate on glyphosate absorption by cultured plant cells. *Weed Science* 39: 347-353 (1991).

Morin F, Vera V, Nurit F, Tissut M e Marigo G. Glyphosate uptake in *Catharanthus roseus* cells: role of a phosphate transporter. *Pest. Biochem. Physiol.* 58:13-22 (1997).

Nascentes RF, Carbonari CA, Simões PS, Brunelli MC, Velini ED e Duke SO. Low doses of glyphosate enhance growth, CO₂ assimilation, stomatal conductance and transpiration in sugarcane and eucalyptus. *Pest managem. Scie.* 74: 1197-1205 (2018).

Novaes E, Kirst M, Chiang V, Winter-Sederoff H, e Sederoff R. Lignin and biomass: a negative correlation for wood formation and lignin content in trees. *Plant Physiology* 154: 555-561 (2010).

Orcaray L, Igal M, Marino D, Zabalza A e Royuela M. The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. *Pest Managem. Scie.* 66: 262-269 (2010).

Pereira FCM, Tayengwa R, Alves PLDCA e Peer WA. Phosphate Status Affects Phosphate Transporter Expression and Glyphosate Uptake and Transport in Grand Eucalyptus (*Eucalyptus grandis*). *Weed Science* 67: 29-40 (2019).

Petersen IL, Hansen HCB, Ravn HW, Sorensen JC e Sorensen, H. Metabolic effects in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings after root exposure to glyphosate. *Pest. Biochem. Physiol.* 89: 220-229 (2007).

Pimentel H, Bray NL, Puente S, Melsted P e Pachter L. Differential analysis of RNA-seq incorporating quantification uncertainty. *Nature methods* 14: 687-697 (2017).

Pline WA, Wilcut JW, Duke SO, Edmisten KL e Wells R. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and non glyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Jour. of Agricult. and Food Chem.* 50: 506-512 (2002).

Popova L, Pancheva T e Uzunova A. Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological rule. *Bulgarian Journal Plant Physiology* 23: 85-93 (1997).

- Reddy KN, Rimando AM e Duke SO. Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *Jour. of Agricult. and Food Chem.* 52: 5139-5143 (2004).
- Reddy KN, Rimando AM, Duke SO e Nandula VK. Aminomethylphosphonic acid accumulation in plant species treated with glyphosate. *Jour. of Agricult. and Food Chem.* 56: 2125-2130 (2008).
- Reddy KN, Bellaloui N e Zablotowicz RM. Glyphosate effect on shikimate, nitrate reductase activity, yield, and seed composition in corn. *Jour. of Agricult. and Food Chem.* 58: 3646–3650 (2010).
- Rouached H, Arpat AB e Poirier Y. Regulation of phosphate starvation responses in plants: signaling players and cross-talks. *Molecular Plant* 3: 288– 299 (2010).
- Rubio V, Linhares F, Solano R, Martin AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes & Development* 15: 2122–2133 (2001).
- Ruuhola T e Julkinen-Tito R. Trade-off between synthesis of salicylates and growth of micropropagated *Salix petandra*. *Journal of Chemistry Ecology* 29: 1565-1588, (2003).
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY e Hunt MD. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8: 1809-1819 (1996).
- Shah J. The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 365-371 (2003).
- Silva FML, Duke SO, Dayan FE e Velini ED. Low doses of glyphosate change the responses of soyabean to subsequent glyphosate treatments. *Weed Research* 56: 124-136 (2016).
- Singh BK e Shaner DL. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. *Weed Technology* 12: 527-530 (1998).
- Tedesco MJ; Gianello C, Bissani CA, Bohnen H e Volkweiss SJ. Análises de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre. *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, 2: 174 (1995).
- Van Soest PJ. Use of detergents in analysis of fibrous feeds. 3. Study of effects of heating and drying on yield of fiber and lignin in forages. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists* 48: 785-790 (1965).

- Velini ED, Alves E, Godoy MC, Meschede DK, Souza RT e Duke SO. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. *Pest Managem. Scie.* 64: 489-496 (2008).
- Velini ED, Duke SO, Trindade MLB, Meschede DK e Carbonari CA. Modo de ação do glyphosate. In: VELINI, ED. et al. *Glyphosate: uso sustentável*. Fepaf: Botucatu, 1: 213 (2012).
- Wanasundara U, Amarowicz R e Shahidi F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola meal. *Jour. of Agricult. and Food Chem.* 42: 1285-1290 (1994).
- Wang CY. Effect of glyphosate on aromatic amino acid metabolism in purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). *Weed Technology* 15: 628-635 (2001).
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahl-Goy P, Metraux JP e Ryals JA. Coordinate gene activity in response to agents than induce systems acquired resistance. *The Plant Cell* 3: 1085-1094 (1991).
- Zenoni S, Ferrarini A, Giacomelli E, Xumerle L, Fasoli M, Malerba G, Bellin D, Pezzotti M, Delledonne M. Characterization of transcriptional complexity during berry development in *Vitis vinifera* using RNA-Seq. *Plant physiology* 152: 1787-1795 (2010).
- Zobiole LHS, Bonini EA, de Oliveira RS, Kremer RJ, Ferrarese-Filho O. Glyphosate affects lignin content and amino acid production in glyphosate-resistant soybean. *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 831-837 (2010).

CAPÍTULO 3

TEORES DE LIGNINA, FÓSFORO E COMPORTAMENTO DE CULTIVARES DE SOJA RR E RR2 APÓS A APLICAÇÃO DE GLYPHOSATE E 2-AMINOINDANO-2-FOSFÔNICO

Resumo

A aplicação de subdoses de glyphosate causa incremento de crescimento e acúmulo de biomassa em plantas de soja. Entender como ocorre o processo de estímulo na soja é importante. o objetivo do presente trabalho foi avaliar o teor de lignina, fósforo e o comportamento de cultivares de soja RR e RR2 após a aplicação de AIP e subdoses de glyphosate. Para isso foram instalados dois experimentos em casa de vegetação no esquema inteiramente casualidade. Nos experimentos foram avaliados os teores de lignina, fósforo, componentes da rota do ácido chiquímico, crescimento e acúmulo de biomassa de duas cultivares RR e duas RR2. A aplicação de AIP e glyphosate reduziram os teores de lignina e fenilalanina nas plantas de soja, porém a aplicação de 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate proporcionou maior acúmulo de biomassa em relação ao AIP e a testemunha. A aplicação de subdoses de glyphosate incrementou o teor de fósforo, de aminoácidos, ácido salicílico, o crescimento e acúmulo de biomassa das plantas de soja RR e RR2, além de reduzir os teores de lignina. A aplicação de AIP demonstrou que a redução de lignina não é o único responsável pelo incremento de biomassa nas plantas de soja RR e RR2. A aplicação de algumas subdoses glyphosate nas plantas de soja RR e RR2 desencadeia mudanças em características das plantas que em conjunto promovem o maior crescimento.

Palavras-chave: suddoses de glyphosate; hormesis; resistência a glyphosate; *Glycine max* L. Merrill.

LIGNIN, PHOSPHORUS CONTENTS AND BEHAVIOR OF SOYBEAN RR AND RR2 CULTIVARS AFTER THE APPLICATION OF GLYPHOSATE AND 2-AMINOINDANO-2-PHOSPHONIC

Abstract

The application of low doses of glyphosate causes increased growth and accumulation of biomass in soybean plants. Understanding how the soy stimulus process occurs is important. the objective of the present work was to evaluate the content of lignin, phosphorus, and the behavior of RR and RR2 soybean cultivars after application of AIP and glyphosate underdoses. For this, two experiments were installed in a greenhouse in a completely randomized corner. In the experiments, the contents of lignin, phosphorus, components of the shikimic acid route, growth, and biomass accumulation of two RR and two RR2 cultivars were evaluated. The application of AIP and glyphosate reduced the levels of lignin and phenylalanine in soybean plants, however the application of 90 g e.a ha⁻¹ of glyphosate provided greater accumulation of biomass in relation to AIP and the control. The application of underdoses of glyphosate increased the content of phosphorus, amino acids, salicylic acid, the growth, and accumulation of biomass of RR and RR2 soybean plants, in addition to reducing lignin levels. The application of AIP demonstrated that the reduction of lignin is not the only responsible for the increase of biomass in the RR and RR2 soybean plants. The application of some glyphosate underdoses in RR and RR2 soybean plants triggers changes in plant characteristics that together promote greater growth.

Keywords: glyphosate low doses; hormesis; glyphosate resistance; *Glycine max* L. Merrill.

3.1 INTRODUÇÃO

O herbicida glyphosate atua no bloqueio da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintetase (EPSPs), que catalisa a reação na qual o chiquimato-3-fosfato reage com fosfoenolpiruvato, formando 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato e fósforo inorgânico (FRANZ et al., 1997; DILL et al. 2008). Quando o glyphosate bloqueia a EPSPs a rota metabólica do ácido chiquímico é paralisada e não há produção dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano (BENTLEY, 1990).

A absorção do glyphosate, envolve uma rápida penetração inicial através da cutícula, seguida por uma fase de absorção mais lenta (PEREIRA et al., 2019). Na planta o glyphosate é translocado principalmente via simplasto, e se acumula em tecidos imaturos e meristemáticos, entretanto, significativo movimento apoplástico também ocorre. A movimentação do glyphosate do apoplasto para o simplasto, pode ser facilitada pelas proteínas de transporte de fosfato (DENIS e DELROT, 1993;

MORIN et al., 1997; GODOY, 2007; PEREIRA et al., 2019), uma vez que o grupo fosfato do glyphosate pode competir com o fósforo pelo transporte para dentro da célula, nos transportadores de fosfato (BRECKE e DUKE, 1980; MERVOSH e BALKE, 1991). Quando as células sinalizam a falta de fósforo é desencadeado a expressão de genes de transportadores de fósforo altamente específicos (RUBIO et al., 2001; ROUACHED et al., 2010). Trabalhos com aplicação de sub doses de glyphosate tem demonstrado que plantas de soja e eucalipto absorvem mais fósforo que nas plantas não tratadas (GODOY, 2007; PEREIRA et al., 2019).

A resistência ao glyphosate (RG) é conferida às plantas de soja RR e RR2, pela inserção do gene cp4-epsps oriundo de *Agrobacterium sp*, que produz uma enzima EPSPs insensível ao glyphosate (DILL et al., 2008). A enzima EPSPs, é importante na rota do ácido chiquímico, a qual é responsável pela produção dos aminoácidos aromáticos (BENTLEY, 1990). Além de importantes para a síntese de proteínas nas plantas, esses aminoácidos, principalmente a fenilalanina, constituem a principal rota para a síntese de compostos fenólicos, incluindo os monolignóis, que são precursores da lignina (BOERJEN et al., 2003). Assim, a inibição da EPSPs pelo glyphosate, pode afetar não apenas a produção de proteínas da soja (BØHN et al., 2014, REDDY et al., 2004, DUKE et al., 2003), mas também a via dos fenilpropanóides e, conseqüentemente, a produção de lignina (ZOBIOLE et al., 2010). No citosol, a rota da lignina inicia-se com a enzima fenilalanina amônia liase (PAL), que desamina a fenilalanina em ácido t-cinâmico (BOERJEN et al., 2003).

Estudos tem demonstrado que a lignina, em maiores quantidades, reduz o crescimento das plantas, bem como o acúmulo de biomassa e produtividade (HU et al., 1999; HUANG et al., 2010; NOVAES et al., 2010). Algumas substâncias têm sido utilizadas para inibir a PAL, e conseqüentemente reduzir o teor de lignina, promovendo maior crescimento em plantas, e um exemplo é o ácido 2-aminoindano-2-fosfônico (AIP) (ZOÑ e AMRHEIN, 1992; JONES e SAXENA, 2013). Alguns trabalhos têm revelado que há diferenças no teor de lignina entre plantas de soja com o gene cp4-epsps e plantas que não contêm esse gene (BONINI et al., 2016; GRIS et al., 2016). Podem ocorrer teores 20% maiores de lignina em cultivares transgênicas (COGHLAN, 1999; GERTZ et al., 1999; KUIPER et al., 2001; BONINI et al., 2016). Uma das hipóteses para esse incremento em lignina nas plantas resistentes ao glyphosate, é o número extra de cópias da enzima EPSPS que entra na rota do ácido chiquímico

(BONINI et al., 2016). Assim, plantas RR e RR2 podem sofrer maior lignificação e consequentemente menor crescimento e desenvolvimento.

Doses reduzidas de glyphosate tem sido reportadas como estimuladoras para o crescimento de plantas, com efeito conhecido como Hormesis (DUKE et al., 2006; VELINI et al., 2008; BRITO et al., 2018). Segundo BRITO et al., (2018) o mecanismo que acontece esse efeito ainda não é conhecido. Uma das hipóteses para o efeito de hormesis do glyphosate é pela redução da enzima EPSPs disponível para a rota do ácido chiquímico, e como a lignina depende dessa rota, há redução dos seus níveis, de modo suficiente para particionar uma maior quantidade de carbono à produção de sacarose, aumentando assim o crescimento da planta (DUKE et al., 2006; VELINI et al., 2008).

Assim, as hipóteses levantadas para esse trabalho são que as cultivares de soja RR e RR2 apresentam maior teor de lignina, resultando em menor crescimento quando não submetidas a aplicação de glyphosate, e que o mesmo, em doses baixas, pode reduzir o teor de lignina, estimular o crescimento e o desenvolvimento. Também é levantada a hipótese de que subdoses de glyphosate estimulam maior absorção de fósforo pelas plantas.

Com isso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o teor de lignina, fósforo e o comportamento de cultivares de soja RR e RR2 após a aplicação de AIP e subdoses de glyphosate.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Características gerais dos experimentos

Foram realizados dois experimentos, conduzidos em casa de vegetação no Núcleo de Pesquisas avançadas em Matologia – Nupam, localizado na Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA, da Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’ Campus de Botucatu – SP. O primeiro experimento foi realizado para avaliar a aplicação foliar de glyphosate em subdoses e ácido 2-aminoindano-2-fosfônico em plantas de soja RR e RR2. O ensaio dois foi realizado para avaliar a aplicação de subdoses de glyphosate em aplicação foliar. Todos os experimentos foram repetidos em dois momentos distintos. As condições proporcionadas pela casa de vegetação

foram de temperaturas médias em torno de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa do ar em 60 % e luz natural.

Para compor as unidades experimentais, foram utilizados vasos com capacidade de 2,8 litros, preenchidos com substrato Carolina® composto por turfa de esfagno, vermiculita e casca de arroz carbonizada, com pH 5,7 ($\pm 0,5$). Foram semeadas 5 sementes por vaso, e após a emergência, foi realizado um desbaste para que permanecessem duas plantas viáveis de soja, por vaso.

Os tratamentos foram aplicados quando as plantas de soja se apresentavam no estágio vegetativo de V3 (três trifólios totalmente expandidos). Para as aplicações foram utilizados um pulverizador, instalado em sala de aplicação fechada, com pressão advinda de ar comprimido, equipado com barra de aplicação contendo seis pontas XR 110.02, espaçadas entre si por 0,5 m e posicionadas a 0,5 m de altura em relação às plantas, com pressão constante de 2 bar e uma velocidade de deslocamento de 1 m s^{-1} , gerando um volume de calda de 200 l ha^{-1} .

3.2.2 Experimento 1. Produção de biomassa, teores de lignina e fenilalanina em soja RR e RR2 após aplicação de glyphosate e ácido 2-aminoindano-2-fosfônico

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado com 16 repetições, em esquema de fatorial duplo 4×3 (cultivares $\times$ tratamentos). Foram utilizadas duas cultivares RR (BMX Tornado e N 5909) e duas cultivares RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO), aplicados com três tratamentos: aplicação de uma dose de glyphosate sal de potássio (90 g e.a ha^{-1}), aplicação de ácido 2-aminoindano-2-fosfônico (AIP) na concentração de $100 \mu\text{M}$ e uma testemunha sem aplicação. Nesses experimentos foram avaliadas a produção de biomassa aos 28DAA, teor de lignina aos 7, 14 e 28 DAA e quantificado o teor do aminoácido fenilalanina aos 7, 14 e 28 DAA.

3.2.3 Experimento 2. Subdoses de glyphosate em soja RR e RR2 com aplicação foliar

O delineamento empregado foi o inteiramente casualizado, com 20 repetições no esquema fatorial duplo 4×7 , no qual foram utilizadas duas cultivares RR (BMX Tornado e N 5909) e duas cultivares RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) e sete doses de glyphosate sal de potássio (0; 5,65; 11,25; 22,5; 45; 90; $180 \text{ g e.a ha}^{-1}$). 15

repetições foram destinadas as coletas para o teor de lignina (5 plantas), fósforo (5 plantas) e componentes da rota do ácido chiquímico (5 plantas) que foi realizada aos 10DAA. As outras 5 repetições foram utilizadas para as medições de altura aos 7, 14, 21 e 28 DAA e coleta da massa da matéria seca aos 28DAA.

3.2.4 Variáveis analisadas

Para avaliação do teor de lignina as plantas de soja foram secas em estufa de circulação forçada a 40°C até atingirem peso constante. Depois foram trituradas em moinho tipo Wiley e analisadas no laboratório de bromatologia, no Departamento de Zootecnia da UNESP/Botucatu. A técnica utilizada foi baseada no método da lignina em detergente ácido (LDA), em que a amostra foi previamente tratada com solução de detergente ácido, resultando na fibra em detergente ácido (FDA), a qual posteriormente foi submetida à digestão com solução concentrada de ácido sulfúrico a 72% (VAN SOEST, 1965). Esta técnica foi adaptada com a utilização de saquinhos confeccionados em TNT 100 (porosidade de 100 micra). Após a digestão, os saquinhos foram colocados em autoclave (120°C por 30 min) e dispostos no interior de garrafão para solução de capacidade de 20 L, contendo 50 mL de solução em detergente ácido por amostra. Em seguida, receberam pré-lavagem com água fria para retirada do excesso de detergente, sendo submetidos a cinco enxágues com água destilada quente (5 min), a seguir as amostras foram escorridos e imersas em acetona (5 min) e secos em estufa (105°C). Posteriormente as amostras foram queimadas em mufla e então calculou-se os valores de lignina (porcentagem) em relação a massa seca inicial.

As plantas coletadas para quantificação do teor de fósforo foram secas em estufa com circulação de ar forçado a 40°C até peso constante. Posteriormente foram trituradas em moinho tipo Wiley. O teor de fósforo foi determinado por digestão ácida conforme metodologia descrita por (Tedesco et al., 1995) e determinado pelo método de colorimetria. A altura foi medida aos 7, 14, 21 e 28 DAA com régua, medindo-se da superfície do solo até a inserção da última folha totalmente expandida. Aos 28 dias as plantas foram cortadas e armazenadas em sacos de papel e posteriormente levadas a estufa de circulação forçada de ar, em temperatura de 60°C, até peso constante. Posteriormente foram pesadas em balança com precisão de quatro dígitos, para obtenção da massa da matéria seca.

Após a coleta das cinco plantas para quantificação dos componentes da rota do ácido chiquímico as amostras foram mantidas na temperatura de -80°C, até o momento do processamento. Após isso as amostras foram maceradas com nitrogênio líquido, utilizando graal e pistilo e secas no vácuo. Pesou-se uma alíquota de 100 mg de cada amostra macerada, acondicionando-as em tubos falcon de 15 mL e posteriormente foram adicionados 10 mL da solução extratora de água acidificada a pH de 2,5. As amostras foram levadas ao banho de ultrassom por 30 minutos. Após centrifugação por 4.000 Rpm por 10 minutos, realizou-se a filtragem do sobrenadante das amostras através de filtros Millipore 0,2 µm, transferindo o conteúdo para vials (1,5 mL) e levando-as para análise em LC/MS/MS. Para determinação dos componentes da rota do ácido chiquímico foi utilizado as mesmas condições cromatográficas descritas no Capítulo 2.

3.2.4 Análise dos dados

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, posteriormente foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e quando significativos, foi realizado o teste de média T (LSD) ($p \leq 0,05$), foram realizados todos os desdobramentos necessários. Foi realizada análise conjunta para os experimentos em duplicata. Para as doses de glyphosate foi realizada a análise de regressão.

Para todos os dados, foi calculado o intervalo de confiança ($p=0,05$) da média (Equação 3) no software Microsoft Excel, o intervalo de confiança será adicionado as médias nos gráficos (média $\pm$ IC).

$$\text{Equação 3: } Ic = \frac{t * DP}{\sqrt{n}}$$

Onde, Ic = Intervalo de confiança, t = valor de t tabelado a 5%, DP = desvio padrão e $\sqrt{n}$ = raiz quadrada do número de repetições.

3.3 RESULTADOS

Para os experimentos em duplicata pela análise conjunta foi possível observar que não ocorreram diferenças significativas entre os experimentos, assim eles foram agrupados e discutidos em conjunto. Para as doses de glyphosate não foi possível o ajuste de um modelo de regressão. Por isso as doses de glyphosate foram comparadas pelo teste de média.

3.3.1 Produção de biomassa, teores de lignina e fenilalanina em soja RR e RR2 após aplicação de glyphosate e ácido 2-aminoindano-2-fosfônico

Em relação aos teores de lignina observou-se que a aplicação de glyphosate e AIP reduziram os teores em relação a testemunha sem aplicação. Aos 7 e 14DAA observou-se que para ambas as cultivares de soja RR e RR2 a aplicação de AIP reduziu significativamente os teores de lignina em relação a glyphosate e a testemunha sem aplicação. O AIP reduziu o teor de lignina em 23% aos 7DAA e 13% aos 14DAA, em relação a testemunha sem aplicação (média das cultivares de soja). A aplicação de glyphosate também reduziu significativamente os teores de lignina em relação a testemunha sem aplicação, aos 7 e 14 DAA essa redução foi de 10% para todas as cultivares. Já aos 28 DAA somente o glyphosate reduziu os teores de lignina (7% em relação a testemunha), para a cultivar RR BMX tornando, diferindo significativamente dos demais tratamentos (Figura 1).

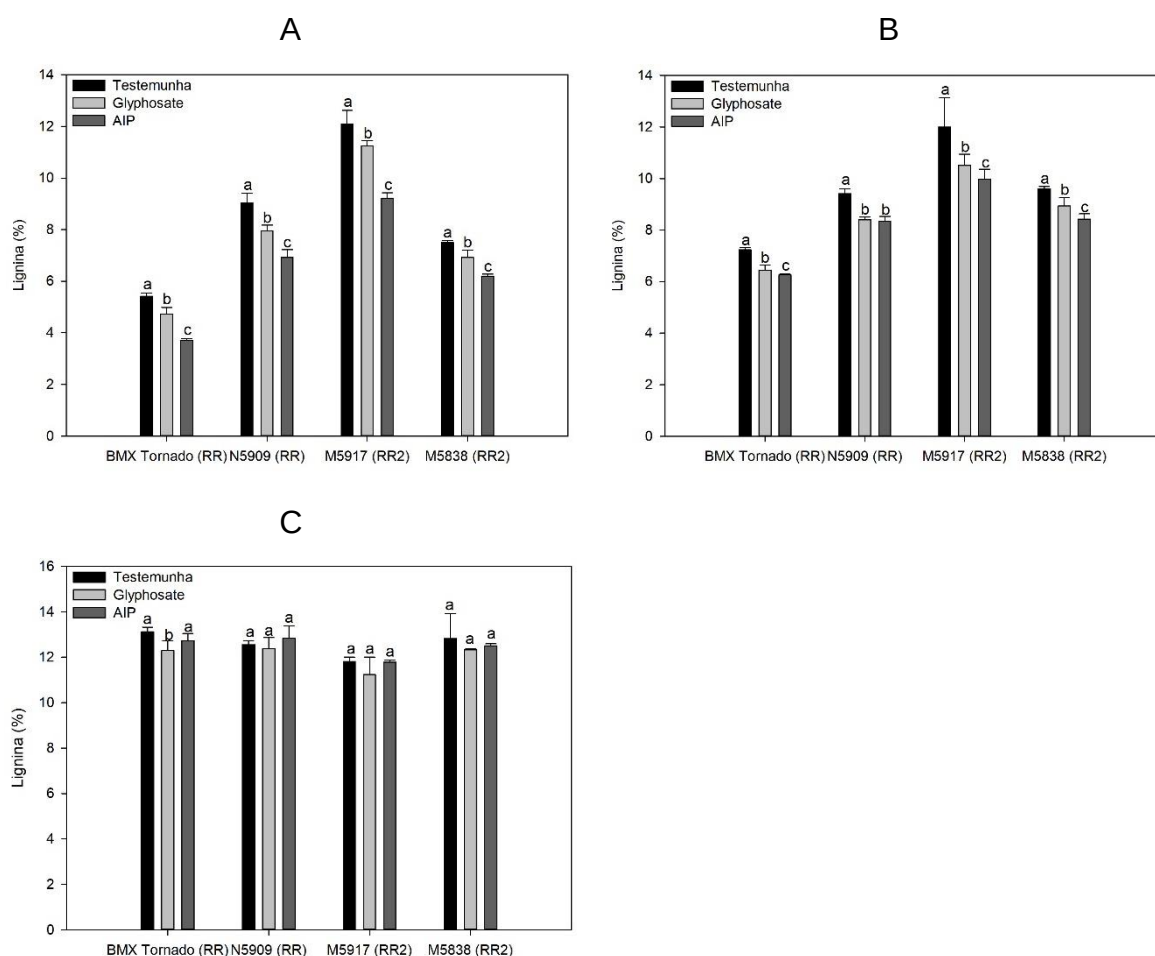


Figura 1. Lignina (% em relação a massa seca) aos 7 (A), 14 (B) e 28 DAA (C) dos cultivares de soja RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO)

após a aplicação de subdose (90 g e.a ha⁻¹) de glyphosate e ácido 2-aminoindano-2-fosfônico (AIP) na concentração de 100µM AIP via aplicação foliar. Média ± intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Os teores de fenilalanina variados nos tratamentos de AIP e glyphosate em relação a testemunha revelam que ambos os tratamentos ocasionaram o efeito esperado de cada molécula, para glyphosate redução dos teores e para AIP incremento nos valores de fenilalanina. A aplicação de glyphosate na dose de 90 g e.a ha⁻¹, reduziu significativamente o teor de fenilalanina em relação a testemunha e a aplicação de AIP aos 7 e 14DAA. Em relação a testemunha a aplicação de glyphosate reduziu em 10 e 6% respectivamente aos 7 e 14 DAA os teores de fenilalanina.

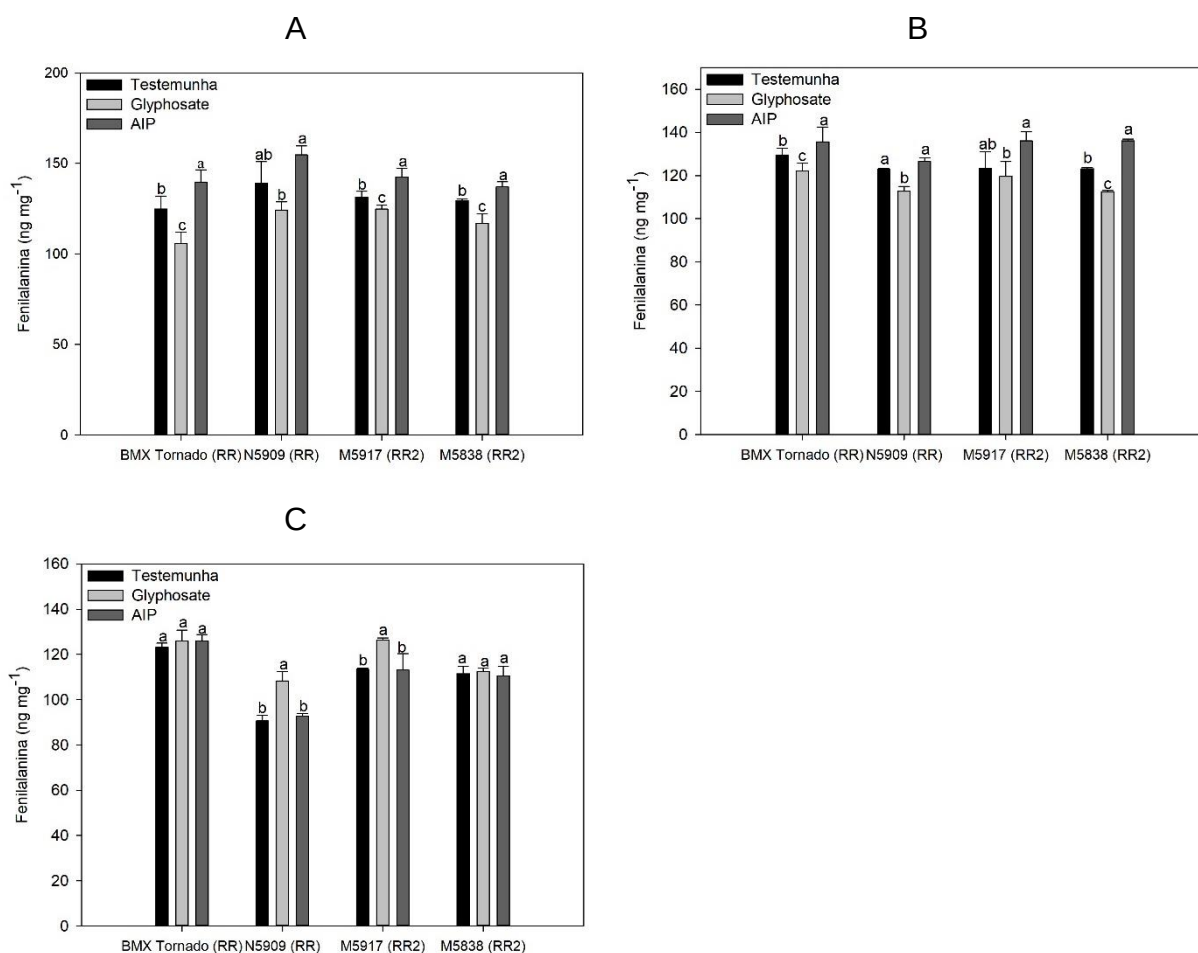


Figura 2. Teor de fenilalanina (ng mg⁻¹) aos 7 (A), 14 (B) e 28 DAA (C) dos cultivares de soja RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) após a aplicação de subdose (90 g e.a ha⁻¹) de glyphosate e ácido 2-aminoindano-2-fosfônico

(AIP) na concentração de 100 μ M AIP via aplicação foliar. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Os teores de fenilalanina nos tratamentos com AIP apresentaram-se maior que a testemunha em todas as cultivares testadas aos 7 e 14DAA, apresentando valores de 2 a 11% maiores que a testemunha. Porém aos 28 DAA possivelmente a PAL não estava mais paralisada pelo AIP resultando em níveis semelhantes de fenilalanina nas plantas de soja e possivelmente esse é um dos fatores de normalização dos níveis de lignina aos 28DAA (Figura 1 e 2). Aos 28DAA somente a aplicação de glyphosate incrementou os teores de fenilalanina em relação aos demais tratamentos nos cultivares N5909 e M5917 IPRO (Figura 2).

Os tratamentos aplicados influenciaram no acúmulo de biomassa nas cultivares de soja estudadas. A aplicação de glyphosate apresentou massa da matéria seca significativamente maior que os demais tratamentos para todas as cultivares. Em relação a testemunha o glyphosate na dose de 90 g e.a ha⁻¹, incrementou a biomassa em 15, 9, 20 e 40% respectivamente para as cultivares BMX tornado, N5909, M5917 e M5838. Observa-se que as cultivares de soja M5917 e M5838 que são RR2, apresentaram maior resposta com a aplicação de glyphosate na dose de 90 g e.a ha⁻¹ quando comparado as cultivares RR. A aplicação de AIP também possibilitou maior biomassa em relação a testemunha, com valores de 8, 5, 6 e 28%, respectivamente para as cultivares BMX tornado, N5909, M5917 e M5838 (Figura 3).

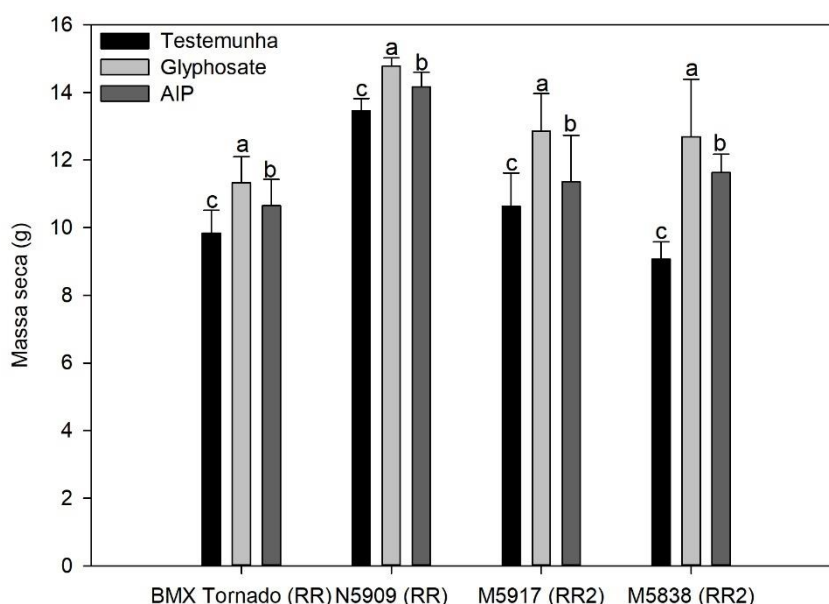
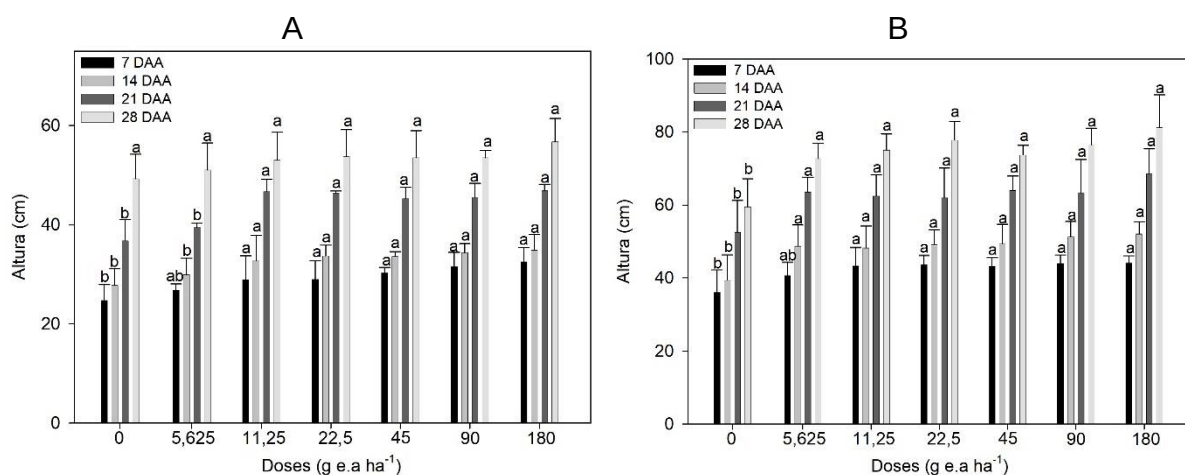


Figura 3. Massa da matéria seca dos cultivares de soja RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) 28 dias após a aplicação de subdose (90 g e.a ha⁻¹) de glyphosate e ácido 2-aminoindano-2-fosfônico (AIP) na concentração de 100µM AIP via aplicação foliar. Média ± intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T (p≤0,05).

3.3.2 Subdoses de glyphosate em soja RR e RR2 com aplicação foliar

A altura de plantas variou conforme a cultivar e doses de glyphosate aplicadas. Para a cultivar RR BMX Tornado observou-se que o intervalo de doses de glyphosate de 11,25 a 180 g e.a ha⁻¹ aumentaram a altura de plantas aos 7, 14 e 21 DAA, já aos 28DAA não são mais observadas diferenças significativas entre as doses de glyphosate aplicadas e a testemunha. Para a cultivar RR N5909 todas as doses de glyphosate aplicadas aumentaram a altura de plantas em relação a testemunha aos 7, 14, 21 e 28 DAA. Aos 7 e 14 DAA para a cultivar de soja RR2 M5917 IPRO as doses entre 11,25 e 180 g e.a ha⁻¹ aumentaram a altura das plantas de soja, já aos 21 e 28 DAA o intervalo de doses entre 5,625 e 180 g e.a ha⁻¹ aumentaram a altura em relação a testemunha. Para a cultivar de soja RR2 M5838 IPRO aos 7 e 14DAA o intervalo de doses de 5,625 e 180 g e.a ha⁻¹ aumentaram a altura de plantas em relação a testemunha. Já aos 21 e 28 DAA o intervalo de doses de 45 e 180 g e.a ha⁻¹ aumentaram a altura em relação as demais doses e a testemunha sem aplicação (Figura 4).



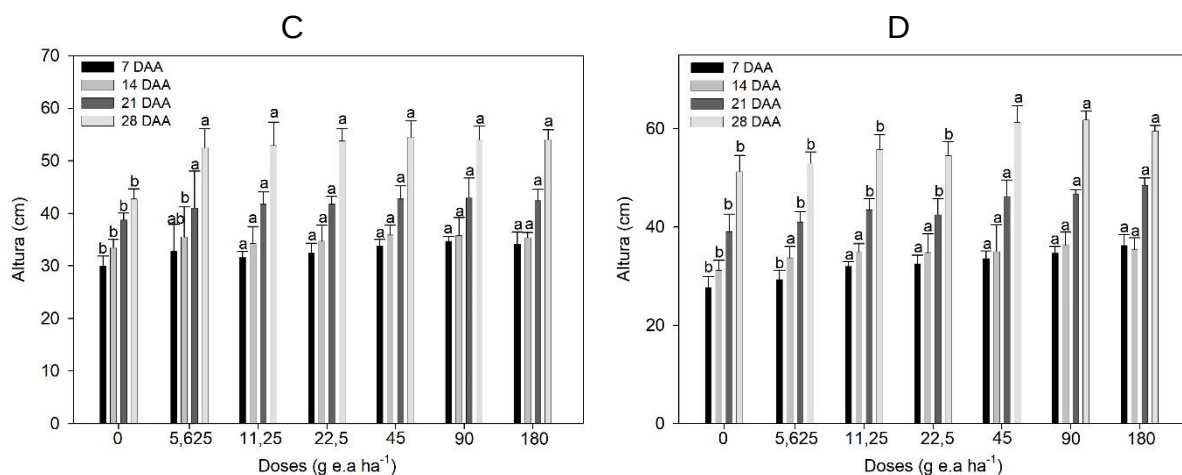
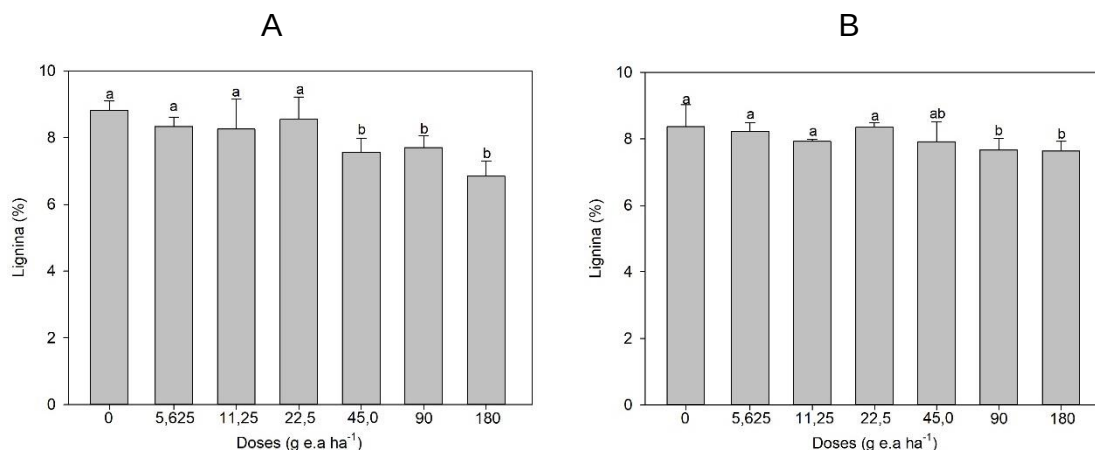


Figura 4. Altura dos cultivares de soja RR (BMX Tornado (A) e N5909(B)) e RR2 (M5917 IPRO (C) e M5838 IPRO (D)) 7, 14, 21 e 28 dias após a aplicação de subdose (0, 5,65, 11,2, 22,5, 45, 90 e 180 g e.a ha⁻¹) de glyphosate via aplicação foliar. Média ± intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

As doses de glyphosate reduziram a porcentagem de lignina em relação a testemunha sem aplicação, para algumas cultivares. Para a cultivar RR BMX Tornado as doses 45, 90 e 180 g e.a ha⁻¹, reduziram em 14, 12 e 22% o teor de lignina em relação a testemunha sem aplicação, respectivamente para as doses de glyphosate. Para as cultivares RRN5909 e RR2 M5838 as doses 90 e 180 g e.a ha⁻¹, reduziram em 9% e 15 e 22% o teor de lignina em relação a testemunha, respectivamente para doses de glyphosate e cultivares de soja. Para a cultivar RR2 M5917 não foram observadas diferenças significativas entre as doses de glyphosate e a testemunha sem aplicação (Figura 5).



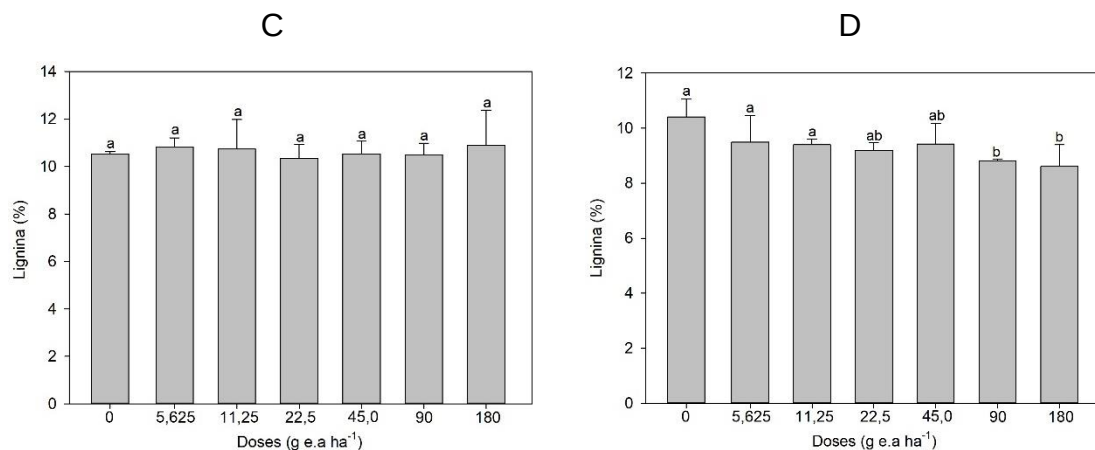
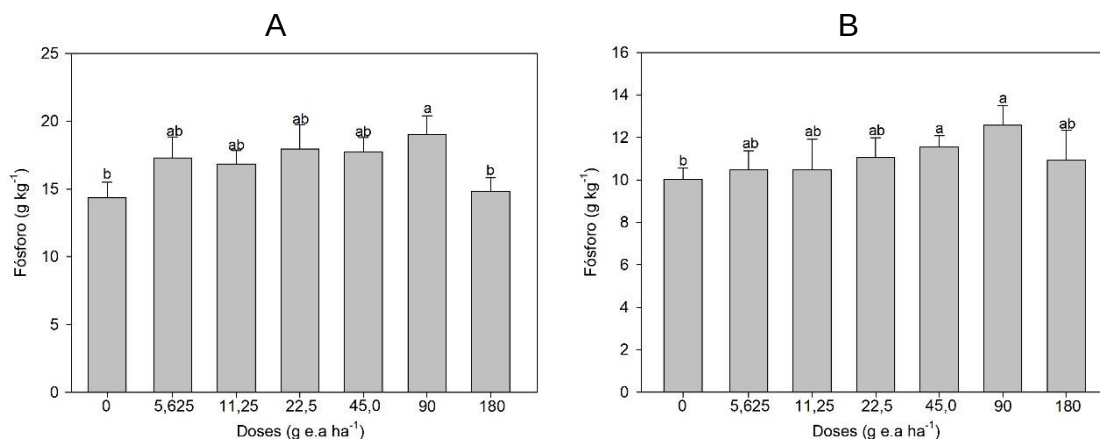


Figura 5. Porcentagem de Lignina dos cultivares de soja RR (BMX Tornado (A) e N5909(B)) e RR2 (M5917 IPRO (C) e M5838 IPRO (D)) 10 dias após a aplicação de subdose (0, 5,65, 11,2, 22,5, 45, 90 e 180 g e.a ha⁻¹) de glyphosate via aplicação foliar. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Para os teores de fósforo na cultivar BMX Tornado a dose de 90 g e.a ha⁻¹ promoveu maior absorção de fósforo em relação a testemunha sem aplicação na ordem de 32%. A aplicação das doses 45 e 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate proporcionaram 15 e 25% mais no teor de fósforo em relação a testemunha sem aplicação de glyphosate na cultivar RR N5909. Para as cultivares de soja RR2 M5917 e M5838 a aplicação das doses 22,5; 45 e 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate aumentaram os teores de fósforo em relação a testemunha sem aplicação em 20, 17 e 16% para a cultivar M5917 e 16, 12 e 6% para a cultivar M5838, respectivamente para as doses de glyphosate (Figura 6).



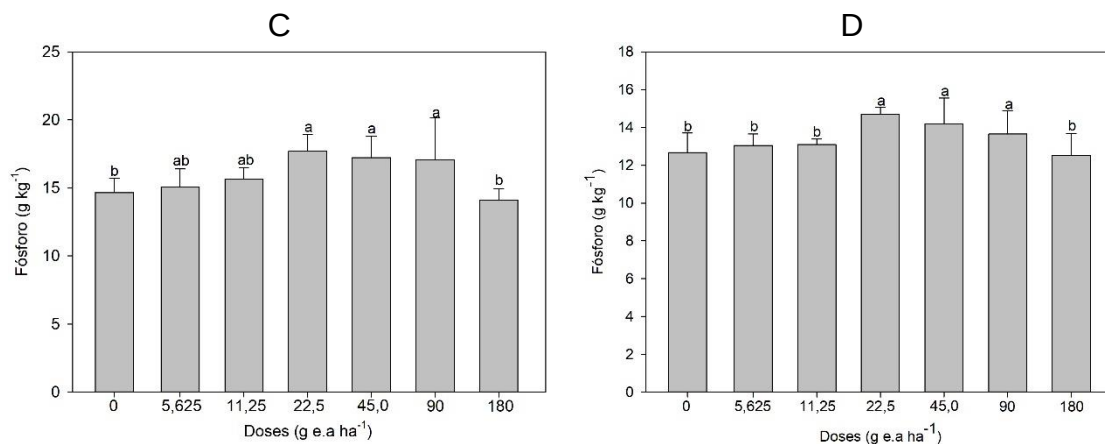


Figura 6. Fósforo (g kg^{-1}) dos cultivares de soja RR (BMX Tornado (A) e N5909(B)) e RR2 (M5917 IPRO (C) e M5838 IPRO (D)) 10 dias após a aplicação de subdoses (0, 5,65, 11,2, 22,5, 45, 90 e 180 g e.a ha^{-1}) de glyphosate via aplicação foliar. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Nas figuras 7, 8, 9 e 10 são apresentados os teores de glyphosate, fenilalanina, tirosina e triptofano para as respectivas doses e cultivares de soja. Para os teores de glyphosate foi possível observar que o incremento interno nas plantas de soja foi proporcional as doses aplicadas, independente do cultivar analisado aos 10 DAA (Figura 7). Na cultivar BMX Tornado a dose de 90 g e.a ha^{-1} de glyphosate apresentou maior teor de fenilalanina diferindo significativamente da testemunha sem glyphosate. A dose de 180 g e.a ha^{-1} de glyphosate reduziu significativamente o teor de fenilalanina em relação a testemunha sem aplicação e em relação as demais doses de glyphosate. Para a cultivar N5909 as doses não influenciaram os teores de fenilalanina. Na cultivar RR2 M5917 a dose de 5,625 g e.a ha^{-1} apresentou teor de fenilalanina significativamente maior em relação a testemunha sem aplicação e da dose 180 g e.a ha^{-1} de glyphosate. As doses 22,5, 45 e 90 g e.a ha^{-1} de glyphosate apresentaram maior teor de fenilalanina, diferindo significativamente da testemunha sem aplicação e das demais doses de glyphosate (Figura 8). Apesar da presença de glyphosate não foram encontrados teores de AMPA (Dados não apresentados).

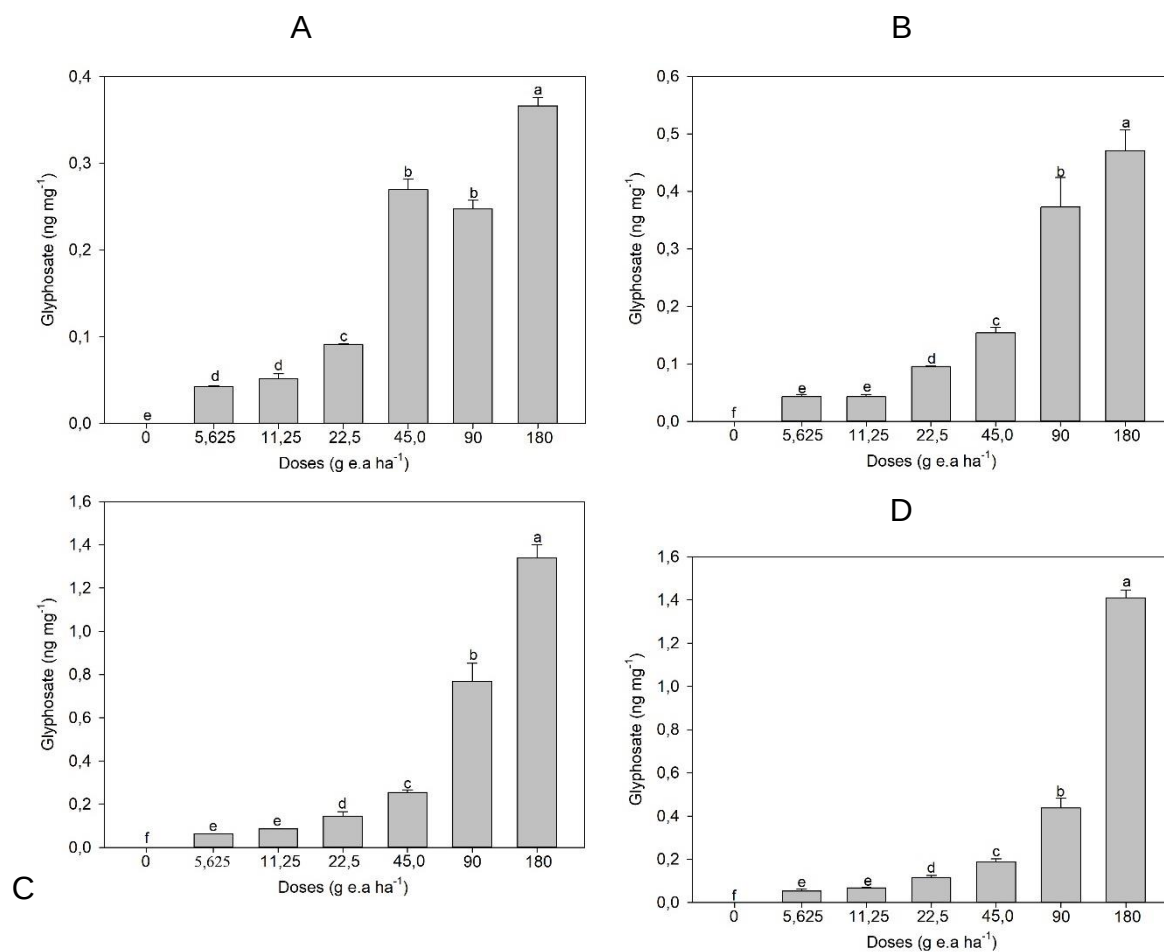
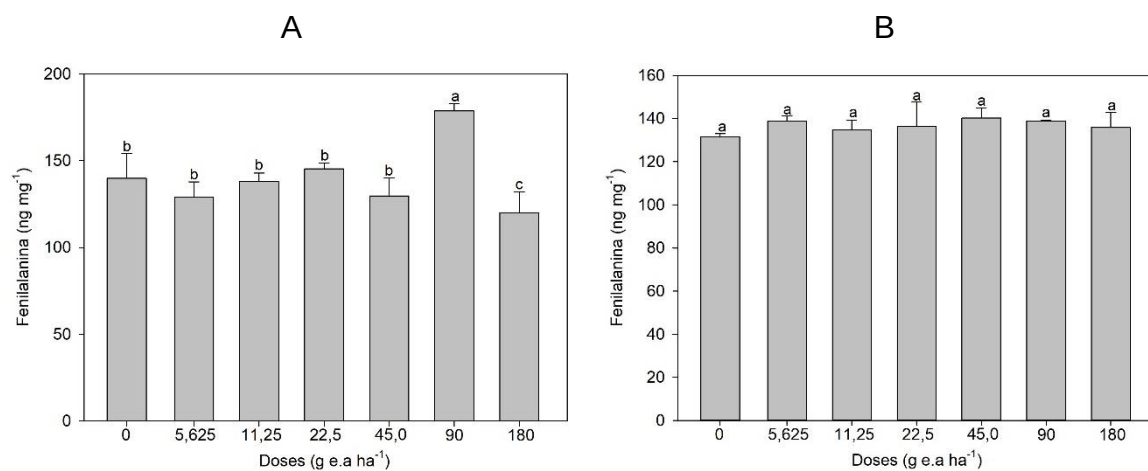


Figura 7. Glyphosate (ng mg⁻¹) dos cultivares de soja RR (BMX Tornado (A) e N5909(B)) e RR2 (M5917 IPRO (C) e M5838 IPRO (D)) 10 dias após a aplicação de subdoses (0, 5,65, 11,2, 22,5, 45, 90 e 180 g e.a ha⁻¹) de glyphosate via aplicação foliar. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).



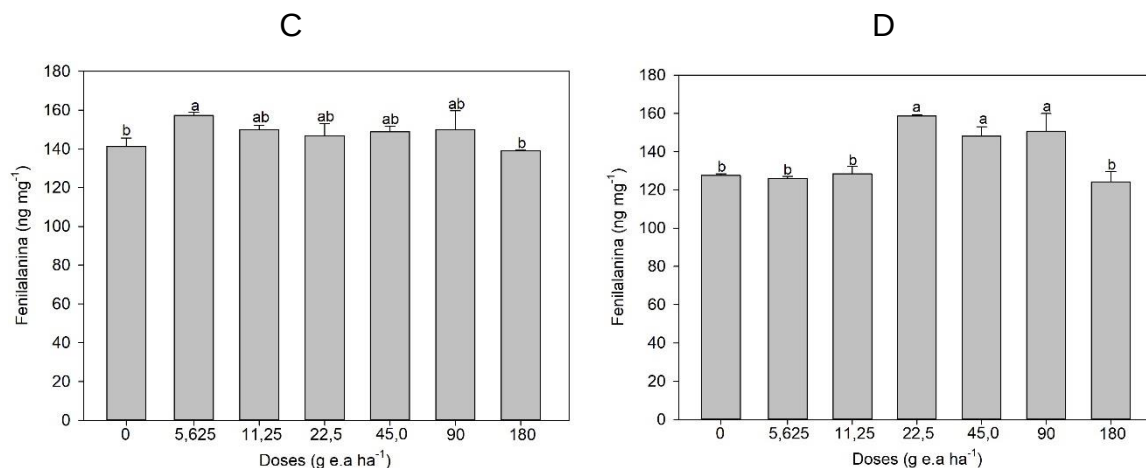


Figura 8. Fenilalanina (ng mg⁻¹) dos cultivares de soja RR (BMX Tornado (A) e N5909(B)) e RR2 (M5917 IPRO (C) e M5838 IPRO (D)) 10 dias após a aplicação de subdoses (0, 5,65, 11,2, 22,5, 45, 90 e 180 g e.a ha⁻¹) de glyphosate via aplicação foliar. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Os teores de tirosina nos cultivares de soja RR (BMX Tornado e N5909) apresentaram decréscimo com o aumento das doses de glyphosate, diferindo significativamente dos teores da testemunha sem aplicação de glyphosate. O comportamento das cultivares RR2 (M5917 e M5838) apresentou-se diferente das cultivares RR, no qual as doses 45 e 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate apresentaram teor de tirosina, significativamente superior a testemunha sem aplicação de glyphosate (Figura 9). Quanto aos teores de triptofano observou-se que para a cultivar BMX Tornado as doses 45 e 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate apresentaram teores significativamente maiores que a testemunha sem aplicação e as demais doses de glyphosate. Para a cultivar RR N5909 as doses de glyphosate não influenciaram nos teores de triptofano. Nas cultivares de soja RR2 M5917 e M5838 as doses 45 e 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate incrementaram significativamente os teores de triptofano em relação a testemunha sem aplicação de glyphosate aos 10DAA (Figura 10).

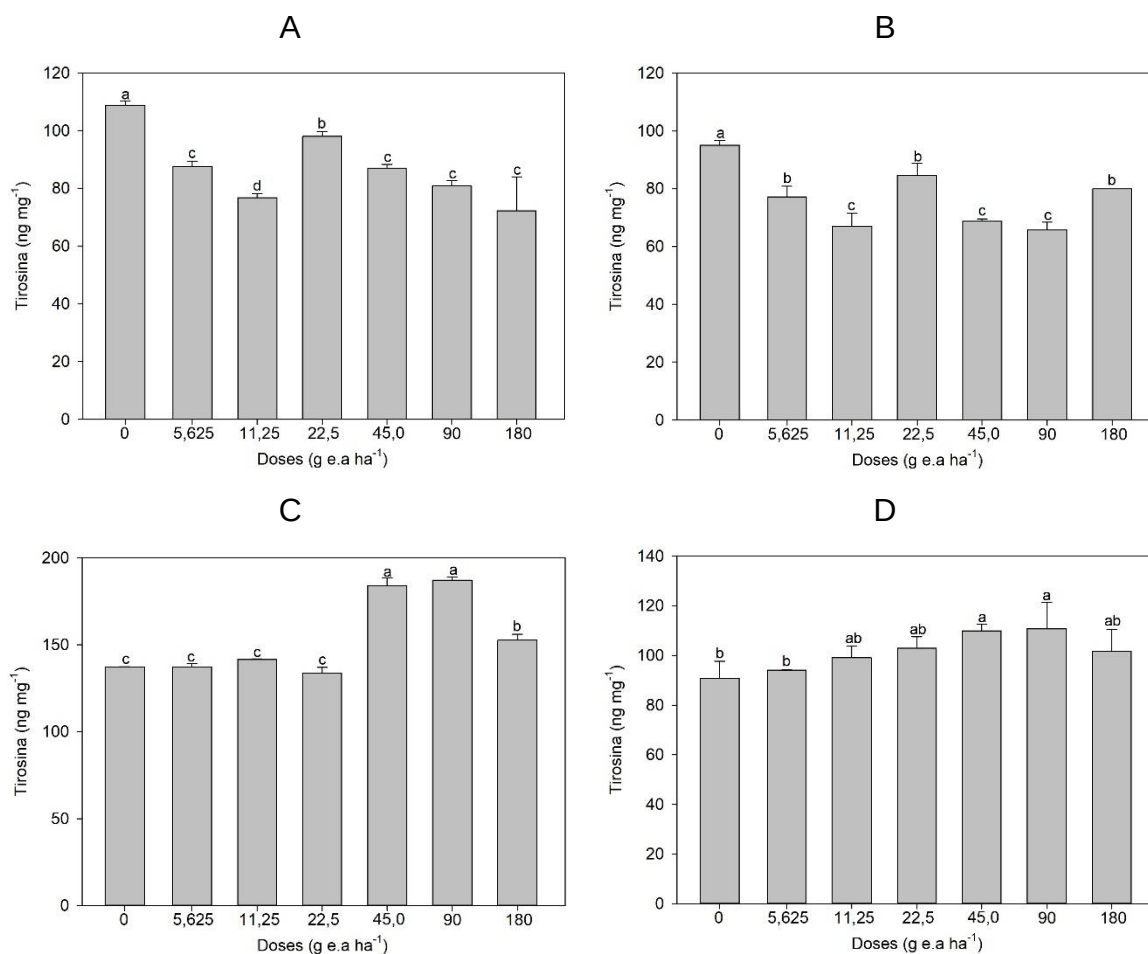
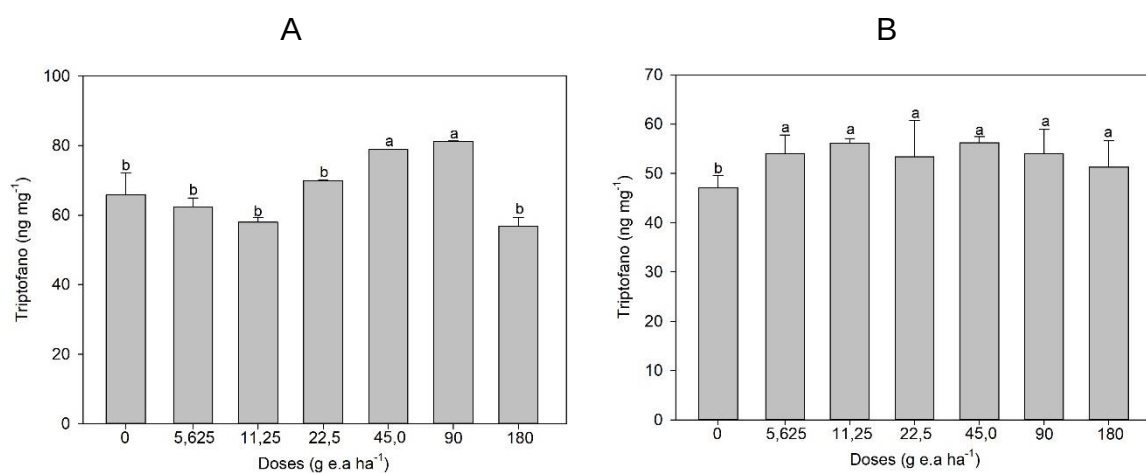


Figura 9. Tirosina (ng mg⁻¹) dos cultivares de soja RR (BMX Tornado (A) e N5909(B)) e RR2 (M5917 IPRO (C) e M5838 IPRO (D)) 10 dias após a aplicação de subdoses (0, 5,65, 11,2, 22,5, 45, 90 e 180 g e.a ha⁻¹) de glyphosate via aplicação foliar. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).



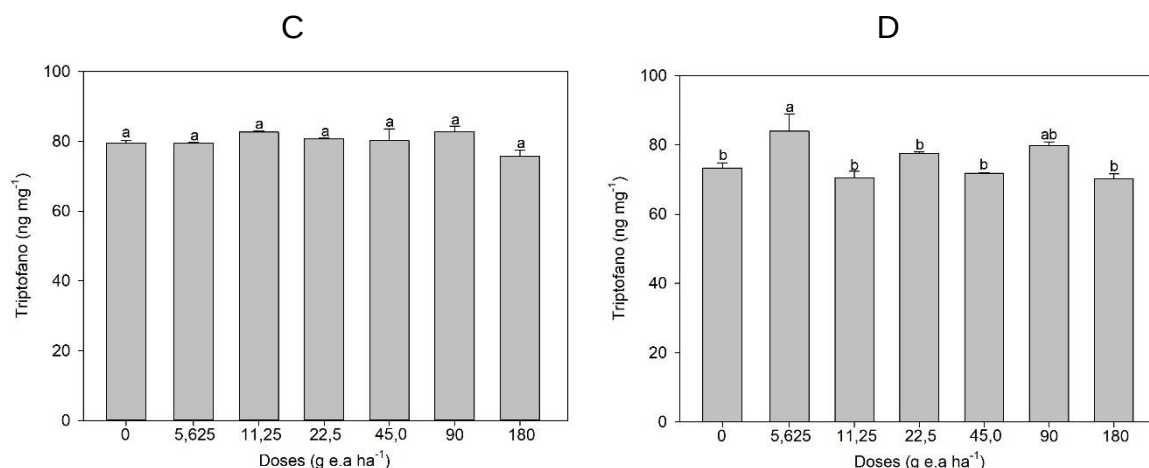


Figura 10. Triptofano (ng mg^{-1}) dos cultivares de soja RR (BMX Tornado (A) e N5909(B)) e RR2 (M5917 IPRO (C) e M5838 IPRO (D)) 10 dias após a aplicação de subdoses (0, 5,65, 11,2, 22,5, 45, 90 e 180 g e.a ha^{-1}) de glyphosate via aplicação foliar. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Os teores do ácido chiquímico apresentaram incremento com o aumento das doses de glyphosate para as cultivares BMX Tornado e M5917 e M5838. Para as cultivares BMX Tornado e M5917 as doses 45, 90 e 180 g e.a ha^{-1} foram significativamente superior a testemunha sem aplicação. Já para a cultivar M5838 o intervalo de doses foi maior 22,5 a 180 g e.a ha^{-1} foram significativamente superior a testemunha e as demais doses de glyphosate. Para a cultivar N5909 as doses de glyphosate não interferiram nos teores do ácido chiquímico (Figura 11). Para as cultivares RR observou-se que as doses de glyphosate incrementaram o teor do ácido cumárico, porém para as cultivares RR2 ocorreu um decréscimo dos teores de ácido cumárico com o aumento das doses. Para a cultivar BMX Tornado a dose de 90 g e.a ha^{-1} de glyphosate incrementou significativamente os teores do ácido cumárico em relação a testemunha e as demais doses de glyphosate. Na cultivar N5909 o intervalo de doses 11,25 a 180 g e.a ha^{-1} de glyphosate aumentaram significativamente os teores de ácido cumárico em relação a testemunha e a dose de 5,625 g e.a ha^{-1} de glyphosate. Para as cultivares de soja RR2 a testemunha apresentou os maiores teores de ácido cumárico, diferindo significativamente das doses de glyphosate (Figura 12).

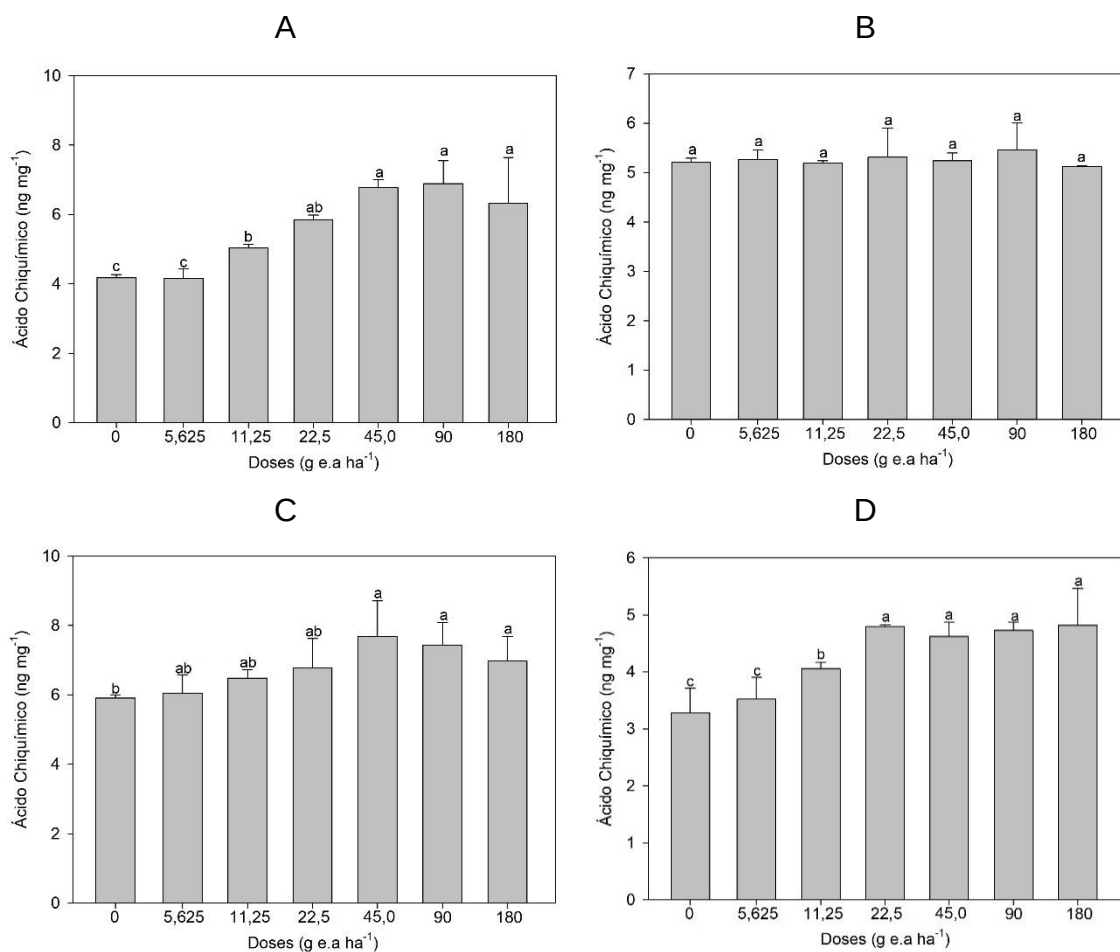
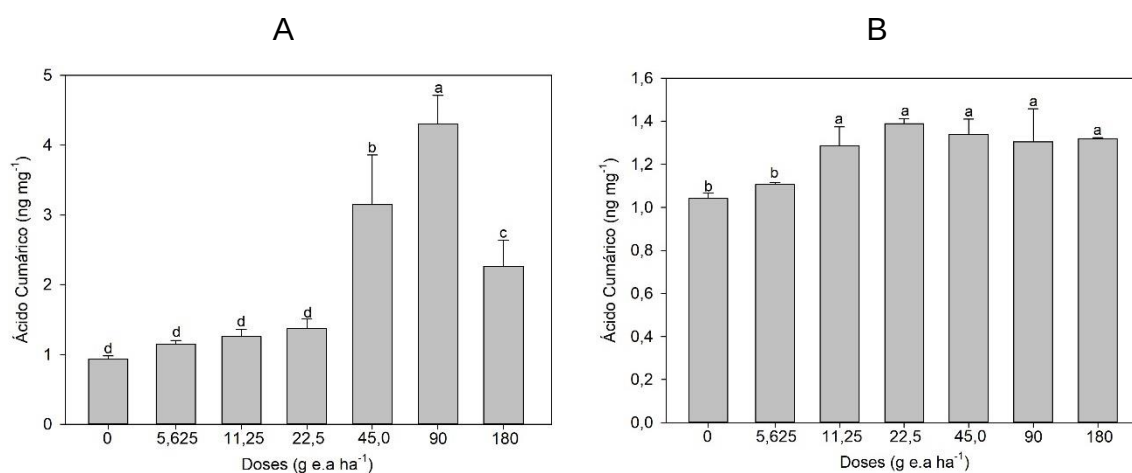


Figura 11. Ácido chiquímico (ng mg⁻¹) dos cultivares de soja RR (BMX Tornado (A) e N5909(B)) e RR2 (M5917 IPRO (C) e M5838 IPRO (D)) 10 dias após a aplicação de subdoses (0, 5,65, 11,2, 22,5, 45, 90 e 180 g e.a ha⁻¹) de glyphosate via aplicação foliar. Média ± intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T (p≤0,05).



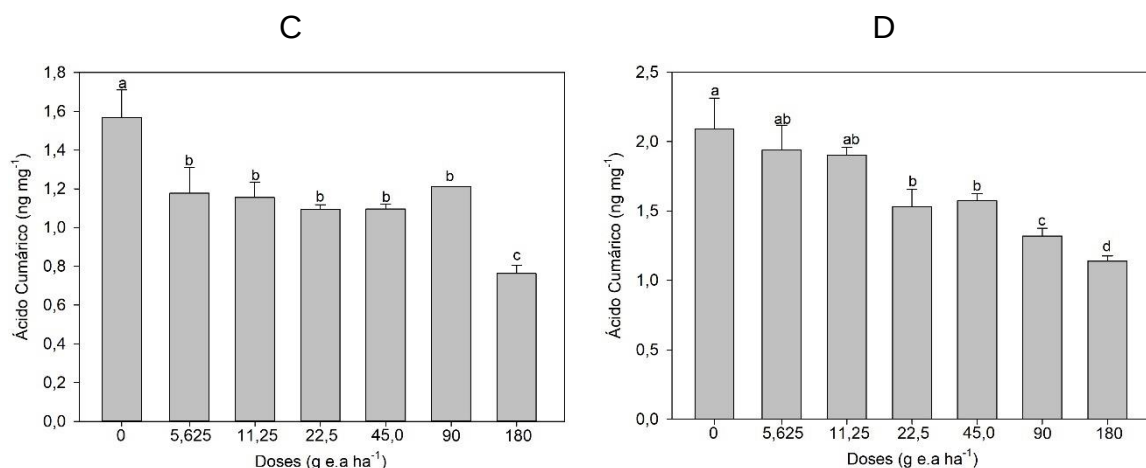


Figura 12. Ácido cumárico (ng mg⁻¹) dos cultivares de soja RR (BMX Tornado (A) e N5909(B)) e RR2 (M5917 IPRO (C) e M5838 IPRO (D)) 10 dias após a aplicação de subdoses (0, 5,65, 11,2, 22,5, 45, 90 e 180 g e.a ha⁻¹) de glyphosate via aplicação foliar. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Para as cultivares BMX Tornado e M5917 as doses 45 e 90 g e.a ha⁻¹ proporcionaram incremento nos teores do ácido benzóico diferindo significativamente das demais doses de glyphosate e da testemunha sem aplicação. Para a cultivar M5838 a dose de 180 g e.a ha⁻¹ de glyphosate reduziu significativamente os teores de ácido benzóico em relação as demais doses e a testemunha sem aplicação. As doses de glyphosate não apresentaram efeito sobre o teor de ácido benzóico na cultivar N5909 (Figura 13). Para os teores do ácido salicílico observou-se nas cultivares N5909 e M5838 que as doses 22,5 a 180 g e.a ha⁻¹ de glyphosate incrementaram os valores desse composto, diferindo significativamente da testemunha e das demais doses de glyphosate. Para a cultivar BMX tornado observou-se que a dose de 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate proporcionou o maior teor de ácido salicílico em relação a testemunha e as demais doses de glyphosate. As doses 45 e 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate incrementaram significativamente os teores do ácido salicílico em relação a testemunha sem aplicação, não diferindo significativamente das demais doses de glyphosate (Figura 14).

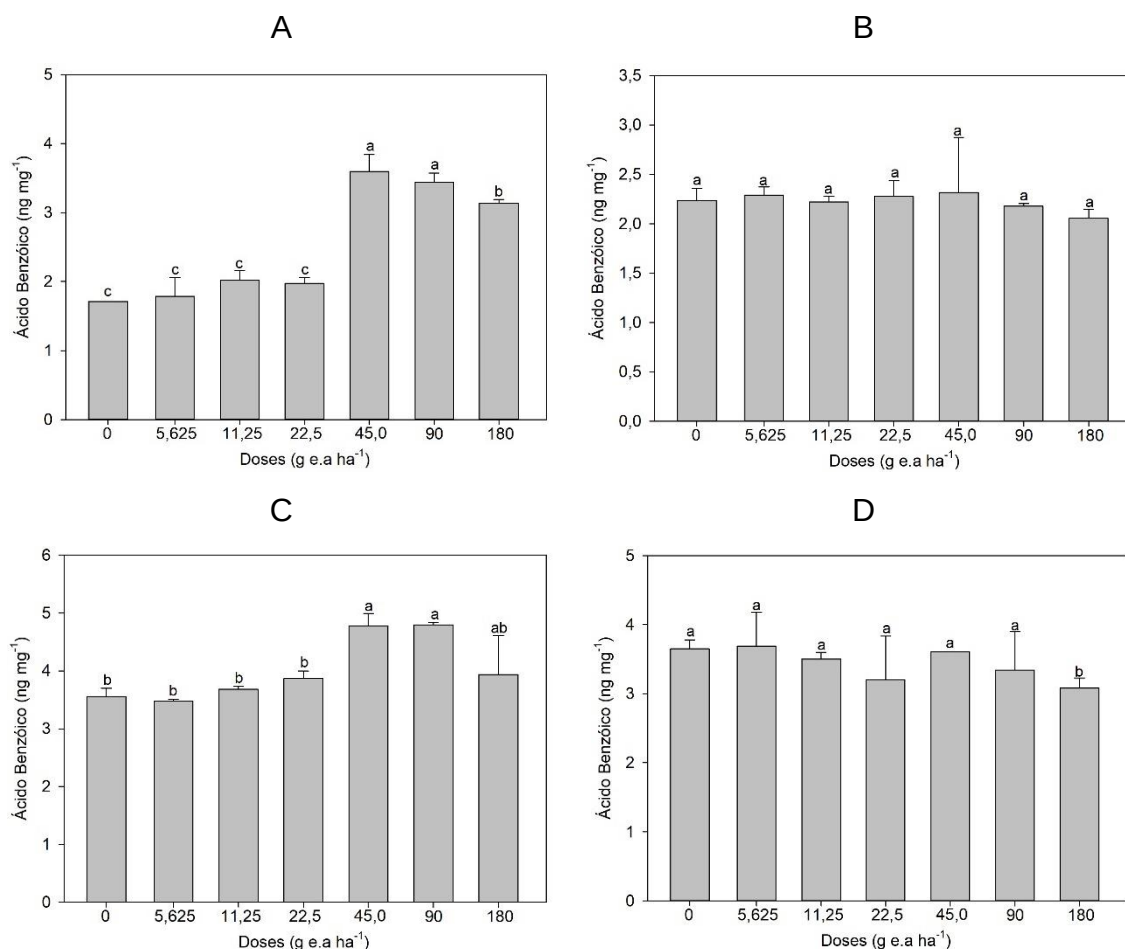
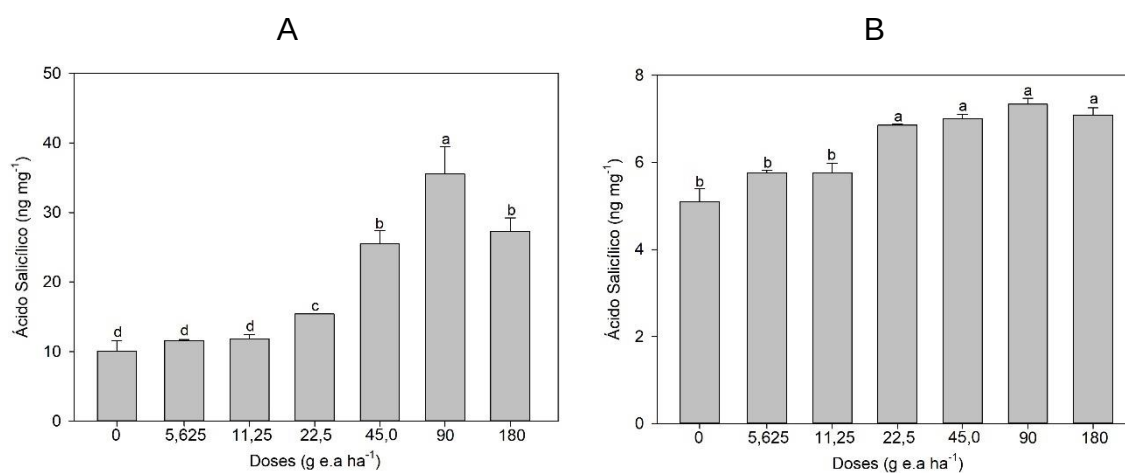


Figura 13. Ácido Benzóico (ng mg⁻¹) dos cultivares de soja RR (BMX Tornado (A) e N5909(B)) e RR2 (M5917 IPRO (C) e M5838 IPRO (D)) 10 dias após a aplicação de subdoses (0, 5,65, 11,2, 22,5, 45, 90 e 180 g e.a ha⁻¹) de glyphosate via aplicação foliar. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).



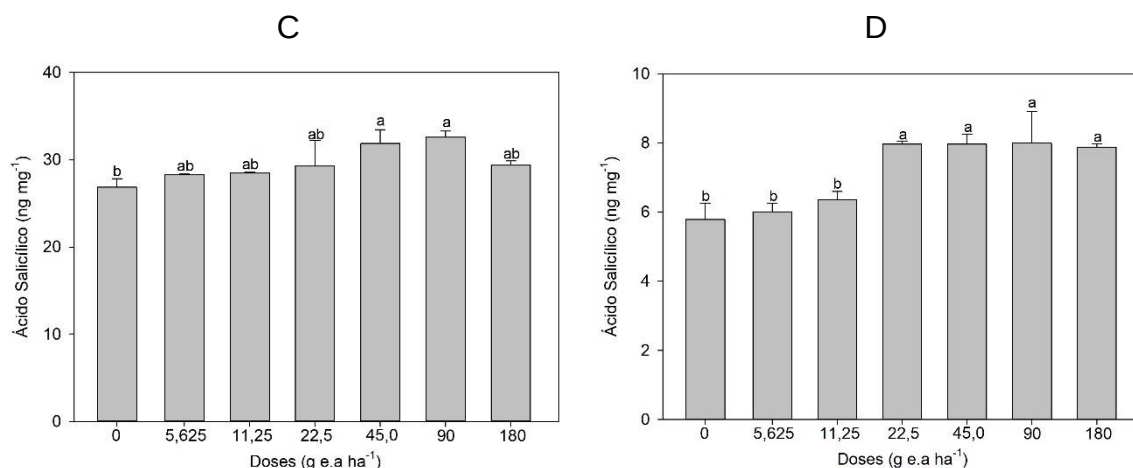


Figura 14. Ácido Salicílico (ng mg⁻¹) dos cultivares de soja RR (BMX Tornado (A) e N5909(B)) e RR2 (M5917 IPRO (C) e M5838 IPRO (D)) 10 dias após a aplicação de subdoses (0, 5,65, 11,2, 22,5, 45, 90 e 180 g e.a ha⁻¹) de glyphosate via aplicação foliar. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Na variável massa da matéria seca de maneira geral as doses de 45, 90 e 180 g e.a ha⁻¹ proporcionaram maior acúmulo de biomassa em relação a testemunha sem aplicação e em relação as demais doses de glyphosate independente da cultivar estudada. Para as cultivares RR as doses 45, 90 e 180 g e.a ha⁻¹ de glyphosate, difeririam da testemunha acumulando 46, 67 e 70% e 21, 25 e 27% mais biomassa do que a testemunha sem aplicação, respectivamente para as cultivares BMX Tornado e N5909. Já para as cultivares RR2 M5917 e M5838 as doses 45, 90 e 180 g e.a ha⁻¹ de glyphosate proporcionaram maior acúmulo de biomassa em relação a testemunha sem aplicação na ordem de 71, 60 e 62% (M5917) e 61, 104 e 108% (M5838), respectivamente para as doses de glyphosate. Nas cultivares RR BMX Tornado e na RR2 5838 as doses 11,25 e 22,5 g e.a ha⁻¹ de glyphosate, também apresentaram maior acúmulo de biomassa em relação a testemunha e a dose de 5,625 g e.a ha⁻¹ de glyphosate (Figura 15).

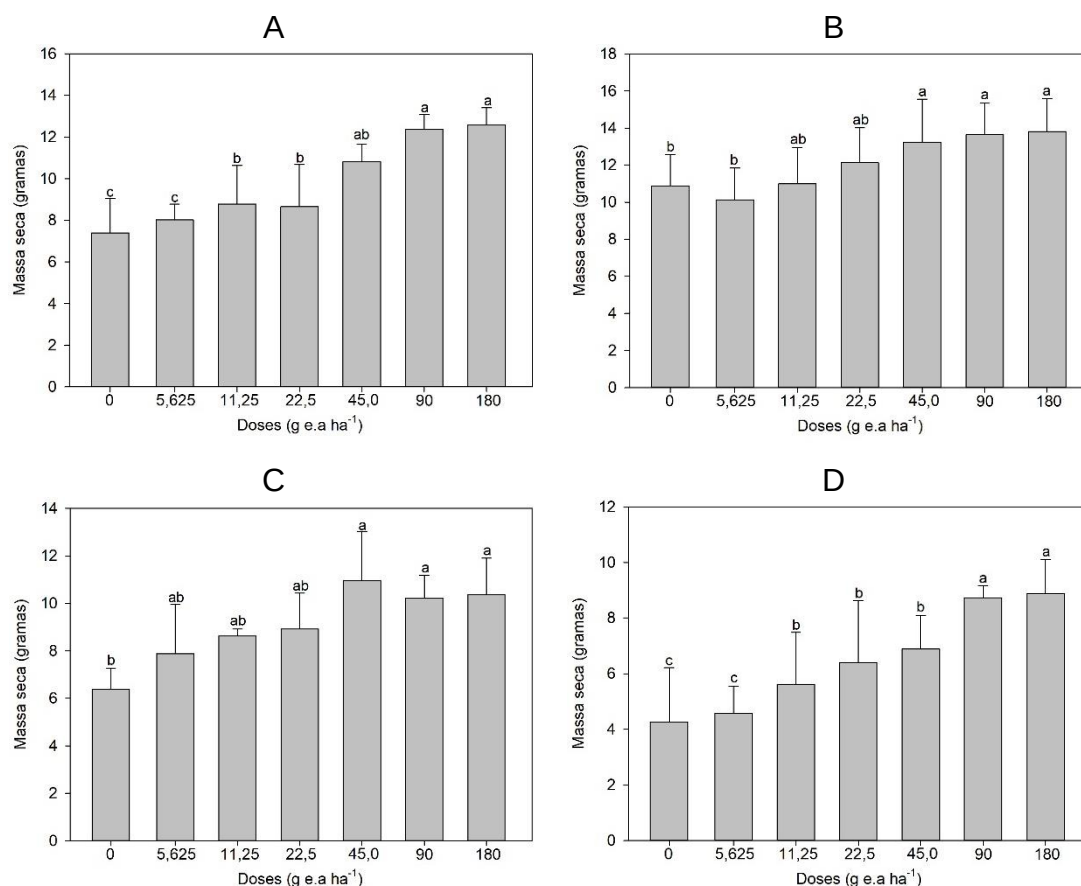


Figura 15. Massa seca das plantas dos cultivares de soja RR (BMX Tornado (A) e N5909(B)) e RR2 (M5917 IPRO (C) e M5838 IPRO (D)) 10 dias após a aplicação de subdose (0, 5,65, 11,2, 22,5, 45, 90 e 180 g e.a ha⁻¹) de glyphosate via aplicação foliar. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Produção de biomassa, teores de lignina e fenilalanina em soja RR e RR2 após aplicação de glyphosate e ácido 2-aminoindano-2-fosfônico

A lignina é produzida no citosol e inicia-se com a enzima fenilalanina amônia liase (PAL), que desamina a fenilalanina em ácido t-cinâmico (BOERJEN et al., 2003). Assim com a paralização da enzima PAL com a aplicação de AIP os teores de lignina decrescem na planta devido a paralização da rota (ZÓN e AMRHEIN, 1992; JONES e SAXENA, 2013). Já o glyphosate pode diminuir os teores de lignina devido a redução dos teores de fenilalanina principal substrato da enzima PAL no processo de produção

da lignina (BOERJEN et al. 2003; ZOBIOLE et al., 2010). Como o glyphosate inibe a enzima EPSPs a rota do ácido chiquímico é alterada e a produção de fenilalanina é diretamente interrompida, reduzindo os seus teores (BENTLEY, 1990; PETERSEN et al., 2007), demonstrando que a enzima EPSPs foi afetada (VELINI et al., 2008). Em trabalho avaliando subdoses de glyphosate SILVA et al., (2016) observou decréscimo do teor de fenilalanina com a aplicação de doses próximas a 90 g e.a ha⁻¹ em soja não resistente ao glyphosate. Como o AIP paralisa a ação da enzima PAL (ZÓN e AMRHEIN, 1992; JONES e SAXENA, 2013) que utiliza o aminoácido fenilalanina na produção de lignina (BOERJEN et al., 2003; TREVINO et al., 2006) o acúmulo de fenilalanina na planta era esperado.

O comportamento de incremento de fenilalanina nos cultivares N5909 e M5917 IPRO aos 28 DAA (Figura 2), pode estar relacionado a uma das hipóteses do efeito de estímulo que é a tentativa de compensar o estresse anterior sofrido pela glyphosate (CALABRESE, 2014; CALABRESE e MATTSON, 2011), consequentemente essa tentativa pode causar respostas fisiológicas que proporcionam maior crescimento e acúmulo de biomassa pelas plantas (VELINI et al., 2008; BELZ et al., 2011; BELZ e DUKE, 2014).

Observa-se que a redução dos teores de lignina da aplicação de AIP (Figura 1) resultou em maior acúmulo de biomassa nas cultivares de soja em relação a testemunha, o que foi evidenciado por outros autores em outras espécies (ZÓN e AMRHEIN, 1992; HU et al., 1999; HUANG et al., 2010; NOVAES et al., 2010; JONES e SAXENA, 2013).

Uma das hipóteses para o efeito de hormesis do glyphosate em plantas é pela redução da enzima EPSPs disponível para a rota do ácido chiquímico, consequentemente redução dos teores de fenilalanina (figura 2), e como a lignina depende dessa rota, há redução dos seus níveis (figura 1), de modo suficiente para particionar uma maior quantidade de carbono à produção de sacarose, aumentando assim o crescimento da planta (figura 3) (DUKE et al., 2006; VELINI et al., 2008). Esse trabalho em cultivares de soja RR e RR2 demonstrou que o teor de lignina realmente influenciou no crescimento das plantas. Porém o que se pode observar é que possivelmente esse não é o único mecanismo envolvido no processo de estímulo de subdoses de glyphosate, pois as plantas aplicadas com glyphosate apresentam maior acúmulo de biomassa quando comparado ao AIP que proporcionou maior redução nos teores de lignina. Assim vários processos dentro da planta podem estar envolvidos

com o aumento de crescimento proporcionado com subdoses de glyphosate. Dentre ele podemos citar a tentativa de compensar um estresse químico (CALABRESE e MATTSON, 2011; CALABRESE, 2014) e maior absorção de fósforo (GODOY, 2007; PEREIRA et al., 2019). Assim todas as hipóteses devem ser levadas em conta no processo de hormesis.

O efeito de hormesis pode acontecer de maneira diferentes para cada espécie e até mesmo dentro da mesma espécie com cultivares diferentes (DUKE et al., 2006; VELINI et al., 2008; BELZ et al., 2011; BELZ e DUKE, 2014). NASCENTES (2016), não encontrou redução dos teores de lignina com aplicação de subdoses de glyphosate em cana-de-açúcar, porém para as plantas de eucalipto o teor de lignina foi reduzido nas doses de glyphosate entre 36 e 180 g e.a ha⁻¹, porém as duas espécies apresentaram incremento de biomassa com as mesmas subdoses de glyphosate. Evidenciando que a lignina pode estar ligada ou não ao efeito de hormesis. No caso da soja RR e RR2 se faz acreditar que o menor teor de lignina junto a outros processos é responsável pelo efeito de estímulo.

3.4.2 Subdoses de glyphosate em soja RR e RR2 com aplicação foliar

A altura de plantas é influenciada pela aplicação de subdoses de glyphosate em outras espécies além da soja. São observados incrementos de altura em café (CARVALHO et al., 2013), *Conyza sumatrensis* (GOMES, 2014) e outras espécies de plantas daninhas de folha larga (NADEEM et al., 2017). A altura de plantas pode estar ligada aos menores teores de lignina proporcionada pelas doses de glyphosate, para as cultivares de soja. Menores teores de lignina nas paredes celulares permite o maior alongamento celular, aumentando o tamanho das células e consequentemente aumento o tamanho das plantas (HU et al., 1999; HUANG et al., 2010; NOVAES et al., 2010). Porém para a altura da cultivar M5917, outro mecanismo pode estar envolvido uma vez que os teores de lignina não foram alterados (Figura 5).

A redução dos teores de lignina está relacionada a paralisação da enzima EPSPs em algum momento após a aplicação de glyphosate, pela falta do aminoácido fenilalanina (BOERJEN et al. 2003; ZOBIOLE et al., 2010). Esse momento parece ser anterior aos 10 DAA pois nos resultados encontrados algumas doses de glyphosate apresentaram incremento de fenilalanina aos 10DAA não justificando a redução de lignina nas plantas de soja (Figura 8). Alguns estudos têm demonstrado que cultivares de soja com o gene cp4-epsps podem apresentar até 20% a mais de lignina quando

comparado a cultivares que não contém esse gene (COGHLAN, 1999; GERTZ et al. 1999; KUIPER et al., 2001; BONINI et al., 2016). Uma das hipóteses para esse incremento em lignina nas plantas com esse gene é o número extra de cópias da enzima EPSPS que entra na rota do ácido chiquímico (BONINI et al., 2016). Somente na cultivar RR2 M5917 que não ocorreu a redução de lignina nesse experimento, segundo GUAN et al., (2010) o gene *cp4-epsps* das cultivares RR2 apresenta pares de bases diferentes da RR, e isso possibilita maior expressão desse gene, e consequentemente mais cópias da enzima EPSPs insensível ao glyphosate, que entra na rota do ácido chiquímico (BONINI et al., 2016). Assim em algumas cultivares maiores doses de glyphosate serão necessárias para redução dos teores de lignina (ZOBIOLE et al., 2010).

Os maiores teores de fósforo após a aplicação de algumas doses de glyphosate pode estar relacionado com a movimentação do glyphosate do apoplasto para o simplasto por proteínas de transporte de fosfato (DENIS e DELROT, 1993; MORIN et al. 1997; GODOY, 2007; PEREIRA et al., 2019). Uma vez que o grupo fosfato do glyphosate pode competir com o fósforo pelo transporte para dentro da célula, nos transportadores de fosfato (BRECKE e DUKE, 1980; MERVOSH e BALKE, 1991). Assim quando as células sinalizam a falta de fósforo é desencadeado a expressão de genes de transportadores de fósforo altamente específicos (RUBIO et al., 2001; ROUACHED et al., 2010; PEREIRA et al., 2019), elevando os níveis de fósforo dentro da planta. Em trabalho de GODOY, (2007) o teor de fósforo foi incrementado em 37% para uma cultivar de soja RR, com a dose de 720 g e.a ha⁻¹, resultados semelhantes ao observado nesse trabalho. Segundo CEDERGREEN et al., (2016) quando há deficiência de fósforo não há resposta positiva de hormesis, quando comparado a presença desse nutriente. Isso fortalece a hipótese de que a dinâmica do fósforo na planta pode ser um dos vários processos incrementados na hormesis. E sua presença no solo ou substrato pode determinar a presença ou ausência da hormesis.

Algumas subdoses de glyphosate proporcionaram maior incremento de fenilalanina, tirosina e triptofano para as cultivares de soja RR e RR2, este estímulo pode estar relacionado a uma resposta fisiológica ao estresse provocado pelo glyphosate (DUKE et al., 2006), uma vez que a rota da EPSPs foi paralisada pela aplicação do glyphosate, devido ao acúmulo de ácido chiquímico (Figura 11) (SINGH e SHANER, 1998; HERNANDEZ et al., 1999; PLINE et al., 2002; REDDY et al., 2010). Outra explicação para o aumento no teor desses aminoácidos pode estar relacionada

com a degradação de proteínas nas plantas e liberação de aminoácidos que a compõem (WANG, 2001; PETERSEN et al., 2007; GRAVENA et al., 2009; ORCARAY et al., 2010). Além disso o aumento desses aminoácidos nas plantas de soja pode desencadear diversas respostas fisiológicas positivas nas plantas devido à grande variedade de compostos produzidos através deles (DEWICK, 1998). Esses aminoácidos dão origem a diversos compostos envolvidos na regulação do crescimento ou na defesa de plantas, destacando-se os taninos condensados, antocianinas, vitamina E, ácido indolacético (IAA), ácido salicílico, flavonas, isoflavonas, fenilpropanóides e cumarinas, fundamentais para o crescimento e desenvolvimento vegetal (VELINI et al., 2012).

Incrementos de ácido chiquímico nas plantas aplicadas com glyphosate, resultam da paralização da enzima EPSPs, e indicam que o efeito do glyphosate nas plantas (HARRING et al., 1998). Porém em espécies sensíveis ao glyphosate os incrementos de ácido chiquímico podem ser 300 vezes maiores que em plantas resistentes ao glyphosate (REDDY et al., 2008). Assim em alguns casos o acúmulo de ácido chiquímico em plantas com o gene cp4-epsps não seria um bom indicador da ação do glyphosate nas plantas, quando não são encontradas diferenças significativas entre a testemunha e as plantas com aplicação de glyphosate (SING e SHANER, 1998; PLINE et al., 2002; NANDULA et al., 2007). O ácido cumárico e ácido benzóico são descritos apresentando características antioxidantes, assim as maiores quantidades nas plantas podem auxiliar no controle e recuperação de estresse oxidativo provocados (HARBORNE, 1973; BELITZ e GROSCH, 1988; DURAN e PADILLA, 1993; WANASUNDARA et al., 1994).

O ácido salicílico apresentou comportamento semelhante ao da fenilalanina, uma vez que a principal rota de produção dele tem como precursora a fenilalanina. Esse composto é o principal envolvido no acionamento de genes de resistência a patógenos biotróficos (WARD et al., 1991; RYALS et al., 1996; POPOVA et al., 1997; BUCHANAN et al., 2000; RUUHOLA e JULKINEN-TITTO, 2003; SHAH, 2003). Assim o aumento dos níveis de ácido salicílico nas plantas de soja RR e RR2 pode tornar essas plantas mais resistentes ao ataque de patógenos, proporcionando maior habilidade de se desenvolver no meio em que estão, quando comparado a plantas que não receberam a aplicação de subdoses de glyphosate.

Observou-se que o acúmulo de biomassa das plantas de soja RR e RR2 foi maior com a aplicação de algumas subdoses de glyphosate. A esse incremento

atribui-se ao aumento de altura das plantas, redução dos teores de lignina, incremento na absorção de fósforo, incremento dos aminoácidos, incremento dos ácidos cumárico, benzóico e salicílico (Figura 4-14). A redução da lignina resulta em alongamento celular e resulta em maior crescimento (NOVAES et al., 2010, HUANG et al., 2010; HU et al., 1999). O fósforo apresenta função na fotossíntese e respiração melhorando o funcionamento do aparato fotossintético, gerando maior quantidade de fotoassimilados e conseqüentemente maior crescimento e acúmulo de biomassa (PREISS, 1984; WALKER e SIVAK, 1986; RAGHOTHAMA, 1999; VERSAW e HARRISON, 2002). O incremento dos aminoácidos proporciona as plantas a produção de inúmeros compostos que desempenham diversas funções dentro da planta (VELINI et al., 2012). O ácido cumárico e benzóico são antioxidantes dentro da planta e o ácido salicílico proporciona maior resistência a patógenos (BELITZ e GROSCH, 1988; WANASUNDARA et al., 1994; GAILLE et al., 2002; RUUHOLA e JULKINEN-TITTO, 2003; SHAH, 2003).

Assim para soja RR e RR2 o efeito de estímulo acontece devido a interação de várias características, atuando em conjunto. Devido a esse fato é muito difícil observar efeito de estímulo acontecendo apenas por uma característica isolada, mais uma vez demonstrando que esse efeito é complexo, de difícil entendimento e pode ocorrer de maneira diferente entre as espécies (BELZ e DUKE, 2014; BELZ et al., 2011; VELINI et al., 2008; DUKE et al., 2006).

3.5 CONCLUSÕES

A aplicação de AIP demonstrou que a redução de lignina não é o único responsável pelo incremento de biomassa nas plantas de soja RR e RR2. A aplicação de algumas subdoses glyphosate nas plantas de soja RR e RR2 desencadeia mudanças em características das plantas que em conjunto promovem o maior crescimento e acúmulo de biomassa.

3.6 REFERÊNCIAS

- Belitz HD, Grosch W. Química de los alimentos. Zaragoza: Acribia, 645- 656 (1988).
 Belz RG e Duke SO. Herbicides and plant hormesis. *Pest Managem. Scie.* 70: 698-707 (2014).
 Belz RG, Cedergreen N e Duke SO. Herbicide hormesis—can it be useful in crop production? *Weed Research* 51: 321-332 (2011).

- Bentley R. The shikimate pathway – a metabolic tree with many branches. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 25: 307-384 (1990).
- Boerjen W, Ralph J e Baucher M. Lignin Biosynthesis. *Annual Revue Plants Biology*, 54: 519-546 (2003).
- Bøhn T, Cuhra M, Traavik T, Sanden M, Fagan J e Primicerio R. Compositional differences in soybeans on the market: glyphosate accumulates in Roundup Ready GM soybeans. *Food chemistry* 153: 207-215 (2014).
- Bonini EEA, da costa Zonetti P, Ferro AP, Ferrarese-Filho O e Ferrarese MDLL. Lignin content in seed coats of Glyphosate-resistant soybean and their respective parents. *African Journal of Agricultural Research* 11: 2524-2527 (2016).
- Brain P e Cousens R. An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research* 29: 93-96 (1989).
- Brecke BJ e Duke WB. Effect of glyphosate on intact bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) and isolated cells. *Plant Physiology* 66: 656-659 (1980).
- Brito IP, Tropaldi L, Carbonari CA e Velini ED. Hormetic effects of glyphosate on plants. *Pest Managem. Scie.* 74: 1064-1070 (2018).
- Buchanan BB, Gruissem W e Jones RL. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 3: 1367 (2000).
- Calabrese EJ. Hormesis: from mainstream to therapy. *Journal of Cell Commun Signal*, 8: 289-291 (2014).
- Calabrese EJ e Mattson MP. Hormesis provides a generalized quantitative estimate of biological plasticity. *Journal of Cell Commun Signal* 5: 25-38 (2011).
- Carvalho LB, Alves PL e Duke SO. Hormesis with glyphosate depends on coffee growth stage. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 85: 813-822 (2013).
- Cedergreen N, Hansen NK e Arentoft BW. The influence of nitrogen and phosphorous status on glyphosate hormesis in *Lemna minor* and *Hordeum vulgare*. *European journal of agronomy* 73: 107-117 (2016).
- Coghlan A (1999). Splitting headache: Monsanto's modified soya beans are cracking up in the heat. Saint Louis: Monsanto. Disponível em: <<http://www.mindfully.org/GE/Monsanto-RR-Soy-Cracking.htm>>. Acessado em: 03 fevereiro de 2022.
- Denis MH e Delrot S. Carrier-mediated uptake of glyphosate in broad bean (*Vicia faba*) via a phosphate transporter. *Physiologia Plantarum* 87: 569–575 (1993).

- Dewick PM. The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Products Reports* 15: 17-58 (1998).
- Dill GM, CaJacob CA e Padgett SR. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. *Pest Managem. Scie.* 64: 326-331 (2008).
- Duke SO, Cedergreen N, Velini ED e Belz RG. Hormesis: is it an important factor in herbicide use and allelopathy? *Outlooks on Pest Management* 17: 29-33 (2006).
- Duke SO, Rimando AM, Pace PF, Reddy KN e Smeda RJ. Isoflavone, glyphosate, and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 340-344 (2003).
- Duran RM e Padilla RB. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Grasas y Aceites* 44: 101-106 (1993).
- Franz JE, Mao MK e Sikorski JA. Glyphosate: a unique global herbicide. American Chemical Society (1997).
- Gaille C, Kast P e Haas D. Salicylate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Purification and characterization of PchB, a novel bifunctional enzyme displaying isochorismate pyruvate-lyase and chorismate mutase activities. *Journal of Biological Chemistry* 277: 21768-21775 (2002).
- Gertz JM, Vencill WR e Hill NS. Tolerance of transgenic soybean (*Glycine max*) to heat stress. *Brighton Crop Protection Conference Weeds* 1: 835-840 (1999).
- Godoy MC. Efeitos do glyphosate sobre o crescimento e absorção de fósforo em soja. Dissertação (Mestrado em Agricultura). Faculdade de Ciências agrônômicas, Unesp, Botucatu – SP. 43 (2007).
- Gomes GLGC. Caracterização bioquímica e morfofisiológica de populações de buva (*conyza spp.*) resistentes ao glyphosate. Tese (Doutorado em Agricultura). Faculdade de Ciências agrônômicas, Unesp, Botucatu – SP. 112 (2014).
- Gravena R, Victoria Filho R, Alves PLC, Mazzafera P e Gravena AR. Low glyphosate rates do not affect Citrus limonia (L.) Osbeck seedlings. *Pest Managem. Scie.* 65: 420-425 (2009).
- Gris CF, Von Pinho EVDR, Krzyzanowski FC, Evangelista JERE, Freiria WCE e Baldoni A. Lignification of the plant and related aspects of soaking seeds and soybean pod of RR and conventional cultivars. *African Journal of Agricultural Research* 11: 1952-1960 (2016).

- Guan X, Guo J, Shen P, Yang L e Zhang D. Visual and rapid detection of two genetically modified soybean events using loop-mediated isothermal amplification method. *Food Analytical Methods* 3: 313-320 (2010).
- Harborne JB. *Phytochemical Methods*. London: Chapman and Hall. 1: 33-88 (1973).
- Harring T, Streibig JC e Husted S. Accumulation of shikimic acid: A technique for screening glyphosate efficiency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4406-4412 (1998).
- Hernandez A, García-Plazaola JI e Becerril JM. Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 2920-2925 (1999).
- Hu WJ, Harding SA, Lung J, Popko JL, Ralph J, Stokke DD e Chiang VL. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nature biotechnology* 17:808-812 (1999).
- Huang J, Gu M, Lai Z, Fan B, Shi K, Zhou YH e Chen Z. Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology* 153: 1526-1538 (2010).
- Jones AMP e Saxena PK. Inhibition of phenylpropanoid biosynthesis in *Artemisia annua* L. a novel approach to reduce oxidative browning in plant tissue culture. *PloS one* 8:e76802 (2013).
- Kuiper HA, Kleter GA, Noteborn HP e Kok EJ. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *The plant journal* 27: 503-528 (2001).
- Mervosh TL e Balke NE. Effects of calcium, magnesium, and phosphate on glyphosate absorption by cultured plant cells. *Weed Science* 39: 347-353 (1991).
- Morin F, Vera V, Nurit F, Tissut M e Marigo G. Glyphosate uptake in *Catharanthus roseus* cells: role of a phosphate transporter. *Pesticide Biochemistry Physiology* 58: 13-22 (1997)
- Nadeem MA, Abbas T, Tanveer A, Maqbool R, Zohaib A e Shehzad MA. Glyphosate hormesis in broad-leaved weeds: a challenge for weed management. *Archives of Agronomy and Soil Science* 63: 344-351 (2017).
- Nandula VK, Reddy KN, Rimando AM, Duke SO e Poston DH. Glyphosate-resistant and -susceptible soybean (*Glycine max*) and canola (*Brassica napus*) dose response and metabolism relationships with glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 3540-3545 (2007).

Nascentes, R. F. Hormesis de glyphosate em cana-de-açúcar e eucalipto. Tese (Doutorado em Agricultura). Faculdade de Ciências agrônômicas, Unesp, Botucatu – SP. 63 (2016).

Novaes E, Kirst M, Chiang V, Winter-Sederoff H e Sederoff R. Lignin and biomass: a negative correlation for wood formation and lignin content in trees. *Plant Physiology* 154: 555-561 (2010).

Orcaray L, Igal M, Marino D, Zabalza A e Royuela M. The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. *Pest Management Science* 66: 262-269 (2010).

Pereira FCM, Tayengwa R, Alves PLDCA e Peer WA. Phosphate Status Affects Phosphate Transporter Expression and Glyphosate Uptake and Transport in Grand Eucalyptus (*Eucalyptus grandis*). *Weed Science* 67: 29-40 (2019).

Petersen IL, Hansen HCB, Ravn HW, Sørensen JC e Sørensen H. Metabolic effects in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings after root exposure to glyphosate. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 89: 220–229 (2007).

Pline WA, Wilcut JW, Duke SO, Edmisten KL e Wells R. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and non glyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 506-512 (2002).

Popova L, Pancheva T, Uzunova, A. Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological rule. *Bulgarian Journal Plant Physiology* 23: 85-93 (1997).

Preiss J. Starch, sucrose biosynthesis and partition of carbon in plants are regulated by orthophosphate and triose-phosphates. *Trends in Biochemical Sciences* 9: 24-27 (1984)

Raghothama KG. Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 665-686 (1999).

Reddy KN, Rimando AM, Duke SO e Nandula VK. Aminomethylphosphonic acid accumulation in plant species treated with glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 2125-2130 (2008).

Reddy KN, Rimando AM e Duke SO. Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5139-5143 (2004).

- Reddy KN, Bellaloui N, Zablotowicz RM. Glyphosate effect on shikimate, nitrate reductase activity, yield, and seed composition in corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:3646–3650 (2010).
- Rouached H, Arpat AB, Poirier Y. Regulation of phosphate starvation responses in plants: signaling players and cross-talks. *Molecular Plant* 3: 288– 299 (2010).
- Rubio V, Linhares F, Solano R, Martin AC, Iglesias J, Leyva A e Paz-Ares J. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes & Development* 15: 2122–2133 (2001).
- Ruuhola T e Julkinen-Tito R. Trade-off between synthesis of salicylates and growth of micropropagated *Salix petandra*. *Journal of Chemistry Ecology* 29: 1565-1588 (2003).
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY e Hunt MD. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8: 1809-1819 (1996).
- Shah J. The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 365-371 (2003).
- Silva FML, Duke SO, Dayan FE e Velini ED. Low doses of glyphosate change the responses of soyabean to subsequent glyphosate treatments. *Weed Research* 56: 124-136 (2016).
- Singh BK e Shaner DL. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. *Weed Technology* 12: 527-530 (1998).
- Tedesco MJ, Gianello C, Bissani CA, Bohnen H e Volkweiss SJ. Análises de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2: 174 (1995).
- Trevino ELL, Chen W, Card ML, Shih MC, Cheng CL e Poulton JE. Arabidopsis thaliana β -glucosidases BGLU45 and BGLU46 hydrolyse monolignol glucosides. *Phytochemistry* 67:1651-1660 (2006).
- Van Soest PJ. Use of detergents in analysis of fibrous feeds. 3. Study of effects of heating and drying on yield of fiber and lignin in forages. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists* 48: 785-790 (1965).
- Velini ED, Duke SO, Trindade MLB, Meschede DK e Carbonari CA. Modo de ação do glyphosate. In: VELINI, E. D. et al. Glyphosate: uso sustentável. Fepaf: Botucatu, 213 (2012).

- Velini ED, Alves E, Godoy MC, Meschede DK, Souza RT e Duke SO. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. *Pest Management Science* 64: 489-496 (2008).
- Versaw WK e Harrison MHA chloroplast phosphate transporter, PHT2;1, influences allocation of phosphate within the plant and phosphate-starvation responses. *Plant Cell* 14: 1751–1766 (2002).
- Walker DA e Sivak MN. Photosynthesis and phosphate: a cellular affair? *Trends in Biochemical Sciences* 11: 176-179 (1986).
- Wanasundara U, Amarowicz R e Shahidi, F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 1285-1290 (1994).
- Wang CY. Effect of glyphosate on aromatic amino acid metabolism in purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). *Weed Technology* 15: 628-635 (2001).
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahl-Goy P, Metraux JP e Ryals JA. Coordinate gene activity in response to agents than induce systems acquired resistance. *The Plant Cell* 3: 1085-1094 (1991).
- Zobiole LHS, Bonini EA, de Oliveira RS, Kremer RJ, Ferrarese-Filho O. Glyphosate affects lignin content and amino acid production in glyphosate-resistant soybean. *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 831-837 (2010).
- Zoń J, e Amrhein N. Inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase: 2-aminoindan-2-phosphonic acid and related compounds. *Liebigs Annalen der Chemie* 1992: 625-628 (1992).

CAPÍTULO 4

CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E RENDIMENTO DE GRÃOS NA SOJA RR E RR2, COM DIFERENTES FORMAS DE APLICAÇÃO DE SUBDOSE DE GLYPHOSATE

Resumo

Subdoses de glyphosate podem ser utilizados a campo para promover o efeito de estímulo em plantas de soja. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o comportamento e produtividade de cultivares de soja RR e RR2 com diferentes formas de aplicação de subdose de glyphosate a campo. Foram realizados quatro experimentos em diferentes locais. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com esquema fatorial 4 x 4, com quatro repetições. Foram utilizadas quatro cultivares de soja, duas cultivares RR (BMX Tornado e N5909) e duas cultivares RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO). Foram quatro tratamentos: aplicação de glyphosate via foliar, tratamento de sementes, aplicação foliar + tratamento de sementes e uma testemunha sem aplicação. A dose de glyphosate sal potássio utilizada foi de 90 g e.a ha⁻¹. Foram observados incrementos de biomassa da parte aérea, radicular e total das plantas de soja, para número e massa de nódulos e número de vagens para as quatro cultivares e locais, para os experimentos com aplicação de glyphosate em relação a testemunha. Quanto aos teores de nutrientes, os maiores incrementos foram para os teores de fósforo e boro, principalmente para o glyphosate aplicado no tratamento de sementes e aplicação foliar + tratamento de sementes em relação a testemunha. Em relação a produtividade de grãos, de modo geral, ocorreram incrementos de produtividade em torno de 4 a 38%, variando conforme local e variedades de soja estudadas, principalmente para o glyphosate aplicado no tratamento de sementes e aplicação foliar + tratamento de sementes em relação a testemunha. Com isso, a utilização do efeito de estímulo da aplicação de glyphosate para aumentar a produtividade da soja RR e RR2 pode ser utilizada a campo, principalmente com aplicação no tratamento de sementes e tratamento de sementes + aplicação foliar da dose de 90 g e.a ha⁻¹.

Palavras-chave: hormesis; soja resistente a glyphosate; *Glycine max* L. Merrill.

AGRONOMIC CHARACTERISTICS AND GRAIN YIELD IN SOYBEAN RR AND RR2, WITH DIFFERENT WAYS OF APPLICATION OF GLYPHOSATE LOW DOSES

Abstract

Low doses of glyphosate can be used in the field to promote the stimulus effect in soybean plants. The objective of the present work was to evaluate the behavior and productivity of RR and RR2 soybean cultivars with different ways of applying glyphosate subdose to the field. Four experiments were carried out in different locations. The experimental design used was a randomized block, with a 4 x 4 factorial scheme, with four replications. Four soybean cultivars were used, two RR cultivars (BMX Tornado and N5909) and two RR2 cultivars (M5917 IPRO and M5838 IPRO). There were four treatments: application of glyphosate via leaf, seed treatment and leaf application + seed treatment and a control without application. The dose of glyphosate potassium salt used was 90 g a.e ha⁻¹. Increments of aerial, root and total biomass of soybean plants were observed, for number and mass of nodules and number of pods for the four cultivars and locations, for experiments with glyphosate application in relation to the control. As for nutrient content, the largest increases were for phosphorus and boron content, mainly for glyphosate applied to seed treatment and foliar application + seed treatment in relation to the control. In relation to grain productivity, in general, there were productivity increases of around 4 to 38%, varying according to the location and varieties of soybean studied, mainly for the glyphosate applied in seed treatment and foliar application + seed treatment in relation to the witness. Thus, the use of the stimulating effect of glyphosate application to increase the productivity of RR and RR2 soybeans can be used in the field, mainly with application in seed treatment and seed treatment + foliar application of the dose of 90 g a.e ha⁻¹.

Keywords: hormesis; glyphosate resistant soybean; *Glycine max* L. Merrill.

4.1 INTRODUÇÃO

A soja é cultivada em diversas partes do mundo, sua área de cultivo mundial é de aproximadamente 127 milhões de hectares com produção total de 362 milhões de toneladas (USDA, 2022). Assim a soja apresenta-se como a principal oleaginosa do

mundo. No Brasil são cultivados em torno de 38 milhões de hectares com produção total de 135 milhões de toneladas com produtividade média de 3206 kg por hectare ou 53 sacas por hectare (CONAB, 2022). A produtividade média brasileira é considerada baixa quando comparadas a algumas áreas manejadas para altas produtividades, no qual as médias podem chegar em torno de 7380 kg por hectare ou 123 sacas por hectare (CESB, 2020).

Do total de área semeada com soja na safra 2019/20, aproximadamente 96,5% são cultivadas com variedades transgênicas (REUTERS, 2020). Desse total, 59,8% foram semeadas com soja considerada como a segunda geração de resistência ao herbicida glyphosate (RR2), que apresenta também resistência a insetos da ordem lepidóptera. Além desta, 36,7% apresentam somente resistência ao herbicida glyphosate (RR – primeira geração) (CÉLERES, 2020). A resistência ao glyphosate é conferida às plantas de soja, pela inserção do gene *cp4-epsps* oriundo de *Agrobacterium* sp, que produz uma enzima EPSPs insensível a ação desse herbicida (DILL et al., 2008). Os materiais RR e RR2 diferem entre si na construção do plasmídeo, no qual a soja RR apresenta o gene *cp4-epsps* original e o promotor 35S e a soja RR2 apresenta o gene *cp4-epsps* modificado e o promotor FMV (promotor do vírus do mosaico da escrofulária) (CTNBIO, 2018). Segundo GREEN (2018), a segunda geração de soja GR apresenta maiores vantagens em rendimento.

O glyphosate atua no bloqueio da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintetase (EPSPs), que catalisa a reação na qual o chiquimato-3-fosfato reage com fosfoenolpiruvato, formando 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato e fósforo inorgânico (FRANZ et al., 1997, DILL et al., 2008). A inibição da EPSPs pela ação do glyphosate, afeta a rota metabólica do ácido chiquímico, a qual produz três aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano, e induz a planta a morte (BENTLEY, 1990).

Doses reduzidas de glyphosate agem como estimuladoras para o crescimento de plantas, com efeito conhecido como Hormesis (BRITO et al., 2018; VELINI et al., 2008; DUKE et al., 2006), e encontrado em diversas culturas com efeitos variados em crescimento e acúmulo de biomassa. Culturas como a soja, milho, cana-de-açúcar, café, eucalipto e pinus apresentaram incremento em características morfológicas, como incremento em biomassa de raiz e parte área (BRITO et al., 2018; NASCENTES et al., 2018; CARVALHO et al., 2013; VELINI et al., 2008; GODOY, 2007). Para cultivares antigas de soja RR não foram observadas diferenças de subdoses de

glyphosate (VELINI et al., 2008). Porém o estímulo de subdoses de glyphosate em aplicação foliar, também acontece em plantas daninhas como a buva e capim amargoso (ANUNCIATO et al., 2021; CESCO, 2018; GOMES, 2014), o que inviabiliza a aplicação a campo quando há presença dessas daninhas em soja. Com isso surge a necessidade de testar diferentes formas de aplicação de subdoses de glyphosate em soja, uma delas pode ser junto ao tratamento de sementes. Segundo BRITO et al., (2018), poucos são os trabalhos avaliando o efeito de estímulo em área agrícolas, não conhecendo-se os efeitos sobre a produtividade e comportamento das plantas em condições de campo.

Diante do potencial de produtividade da soja que pode ser alcançado e da necessidade de aumento da produção da soja, sem avançar o cultivo em áreas de vegetação nativa, estudos que acarretem aumentos de produtividade sem aumento de custos são importantes para o cenário da soja mundial. Aproveitando a resposta positiva de subdoses de glyphosate em diversas culturas e plantas daninhas, uma nova forma de aplicação dessas subdoses deve ser testada a campo. Também se justifica a realização de estudos nesse tema pela falta de experimentos a campo e devido a presença de cultivares RR e RR2 com alta capacidade produtiva. Enfim trabalhos que permitem que essa prática possa se tornar aplicável a campo são importantes.

Com isso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o desempenho agrônômico e produtividade de cultivares de soja RR e RR2 com diferentes formas de aplicação de subdose de glyphosate a campo.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos a campo em quatro locais: Marechal Cândido Rondon – PR (24°41'01.0"S 54°07'11.8"W), Palotina – PR (24°11'43.6"S 53°48'26.3"W), Assis Chateaubriand – PR (24°14'47.2"S 53°37'43.7"W) e Botucatu – SP (22°49'33.8"S 48°25'47.8"W). Os experimentos foram realizados na safra 2018/19. As características químicas de cada solo são apresentadas na Tabela 1. Foi realizada a calagem anteriormente a semeadura da soja com o objetivo de elevar o V% para 60 e em seguida uma gradagem pesada. No momento da semeadura, foi realizada uma adubação envolvendo a formulação 08-20-16 de NPK, em ambos os locais. A calagem e a adubação foram realizadas de acordo com as recomendações obtidas na interpretação da análise de solo.

Tabela 1 - Características químicas e físicas do solo das áreas experimentais de M.C. Rondon, Palotina, Assis Chateaubriand e Botucatu da camada de 0-20 cm.

Propriedades Químicas										
Local	pH	M.O.	P _{resina}	Al ³⁺	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%
	CaCl ₂	g/dm ³	mg/dm ³	mmol _c /dm ³						
M.C.Rondon	5,6	36,4	22,27	0	4,87	12,6	5,14	23	116	58
Palotina	5,1	18,2	20,81	0	5,12	10,46	2,54	18	94	55
Assis Chat.	6,2	21,9	22,15	0	8,71	11,45	5,87	26	111	58
Botucatu	5,4	17	20,42	0	6,11	18	10	35	101	60
Propriedades Físicas										
Local	Areia	Silte	Argila	Textura						
	g kg ⁻¹									
M.C.Rondon	157,5	235	607,5	Argiloso						
Palotina	310	201	489	Argiloso						
Assis Chat.	230	245	525	Argiloso						
Botucatu	195	278	527	Argiloso						

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com esquema fatorial 4 x 4, com quatro repetições. Foram utilizadas quatro cultivares de soja, duas cultivares RR (BMX Tornado e N5909) e duas cultivares RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO). Foram aplicados quatro tratamentos: aplicação de glyphosate via foliar, tratamento de sementes e aplicação foliar + tratamento de sementes e uma testemunha sem aplicação. A dose de glyphosate sal potássio utilizada foi de 90 g e.a ha⁻¹, tanto para aplicação foliar como no tratamento de sementes. As parcelas foram constituídas por seis linhas de soja, espaçadas 0,45 cm entre si e com cinco metros de comprimento. Foi realizado a semeadura para que permaneçam viáveis 330 mil plantas por hectare. Para o controle de plantas daninhas na soja foi utilizado uma dose de glyphosate (sal Di-amônio) na dose de 720 g e.a ha⁻¹ no estágio de V4.

A aplicação dos tratamentos via foliar, foi realizada no estágio fenológico V3 da soja (três trifólios totalmente expandidos), utilizando pulverizador costal pressurizado a CO₂, com pressão constante de 2 BAR (ou 29 PSI), vazão de 0,65 L min.⁻¹, equipado com barra contendo 6 bicos com espaçamento de 50 cm com pontas do tipo jato plano

e modelo XR 110.02 (Teejet). A pulverização foi realizada a uma altura de 50 cm do alvo em velocidade de 1 m s^{-1} e com volume de calda de 200 l ha^{-1} . O tratamento de sementes foi simulado pelo método “on farm”, misturando-se a dose de glyphosate junto do adjuvante organosiliconado (Silwet® na concentração de 0,05%) em saco plástico até observar que todas as sementes se apresentavam tratadas. Para cada tratamento foram tratados 2 kg de sementes por experimento. As sementes também foram tratadas com o produto a base de piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil na dose de 200 ml para 100Kg de sementes, foram ainda adicionados o inoculante turfoso com as seguintes estirpes Semia 587 + Semia 5019 na dose de 250 gramas para 50 Kg de sementes. Após o tratamento as sementes ficaram a sombra para secar e posteriormente foram semeadas. As condições meteorológicas no momento da aplicação para temperatura foram de 28, 25, 29 e 27°C , umidade relativa do ar de 60, 64, 66 e 56 % e velocidade do vento de 1,27; 2,56; 0,98 e $1,46 \text{ km h}^{-1}$, para a aplicação em M. C. Rondon, Palotina, Assis Chateaubriand e Botucatu respectivamente. Os dados meteorológicos de temperatura máxima e mínima e precipitação obtidos durante a condução dos experimentos estão descritos na Figura 1.

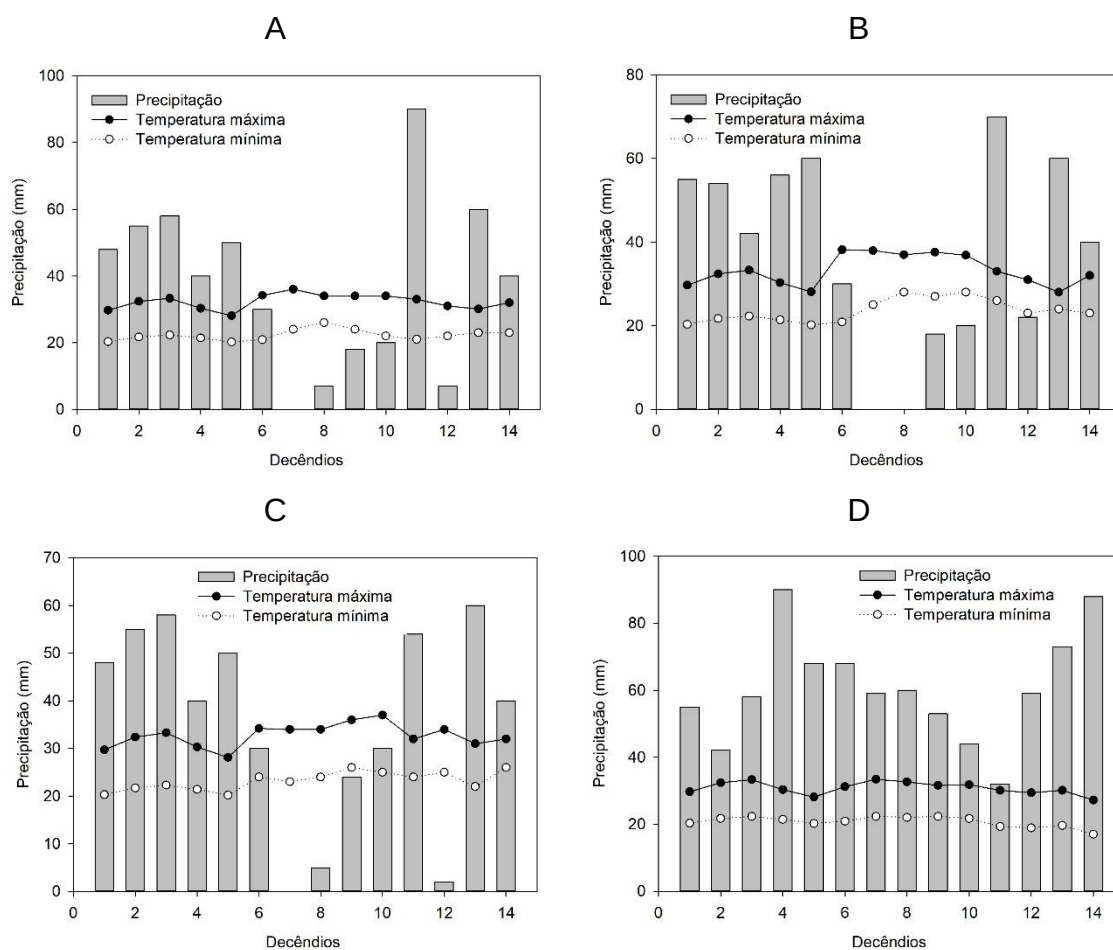


Figura 1. Representação da precipitação, temperatura média mínima e temperatura média máxima para o período entre 15 de setembro e 15 fevereiro, referente a safra de 2018/19 nos municípios de M. C. Rondon (A), Palotina (B), Assis Chateaubriand (C) e Botucatu (D). Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia do Brasil (INMET).

Durante o experimento, foram realizadas as avaliações das seguintes variáveis: altura final de plantas, massa seca da parte aérea, radicular e total das plantas, número e massa seca dos nódulos, teores de macro e micronutrientes, número de vagens e produtividade. No estágio de R1, cinco plantas por parcela foram coletadas e analisou-se a massa seca da parte aérea, radicular e total das plantas, número e massa seca de nódulos, somente para o experimento em Botucatu essas variáveis não foram avaliadas. A altura final das plantas foi avaliada com auxílio de régua, medindo-se da superfície do solo até a última folha totalmente expandida de 10 plantas escolhidas ao acaso em cada parcela. O número de vagens foi contado no estágio R7 (maturidade fisiológica), em 10 plantas escolhidas ao acaso por parcela. Foram coletados 10 trifólios de plantas de soja do terceiro nó do ápice para a superfície do solo em R1 para quantificar os teores de macro e micronutrientes. Para a determinação dos nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn) foram utilizados os métodos descritos por (Malavolta et al., 1997).

Para a produtividade, duas fileiras centrais com quatro metros de comprimento das parcelas, foram colhidas e debulhadas em trilhadora para experimentos. As amostras foram limpas com auxílio de peneiras e acondicionadas em sacos de papel. Partindo-se do rendimento dos grãos nas parcelas, foi calculado a produtividade em kg ha^{-1} , para cada tratamento e repetição. Para o cálculo da produtividade, o grau de umidade das sementes foi corrigido para 13% base úmida.

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de T ($p \leq 0,05$). Foi realizada a análise conjunta dos experimentos. O intervalo de confiança foi calculado para cada média (Média $\pm$ intervalo de confiança) de todas as variáveis analisadas (Equação 1).

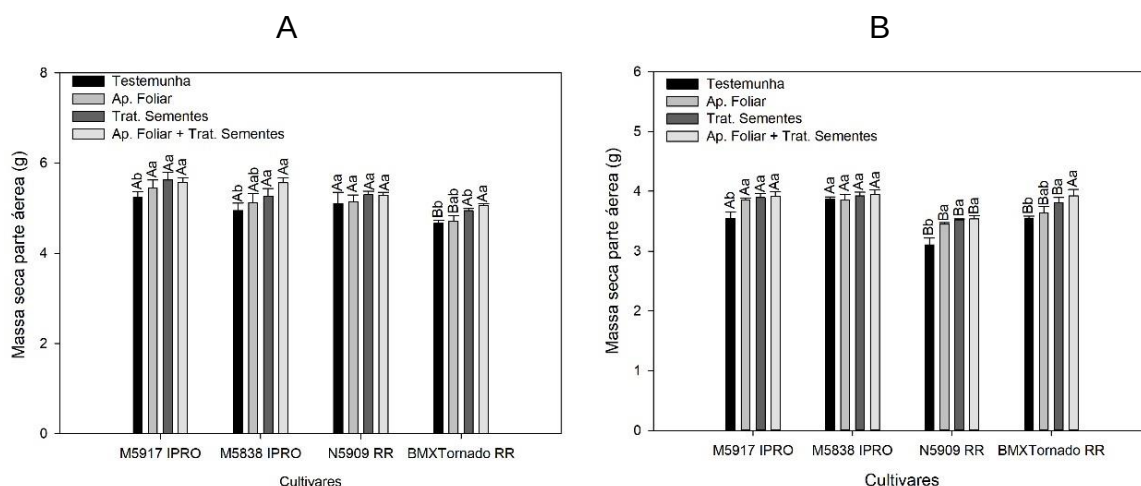
$$\text{Equação 1: } Ic = \frac{t * DP}{\sqrt{n}}$$

Onde, Ic = Intervalo de confiança, t = valor de t tabelado a 5%, DP = desvio padrão e $\sqrt{n}$ = raiz quadrada do número de repetições.

4.3 RESULTADOS

Não foi possível juntar os dados dos experimentos nas diferentes localidades por meio da análise conjunta, pois a diferença foi significativa para todas as variáveis analisadas em relação aos locais de realização dos experimentos. Assim os dados serão discutidos e apresentados separadamente para cada local.

Em relação as cultivares de soja para a variável massa seca da parte aérea, observou-se que para a cultivar BMX tornado a testemunha sem aplicação e o tratamento com glyphosate por aplicação foliar foram significativamente menores em relação as demais cultivares na localidade de M.C. Rondon (Figura 2A). Em Palotina para a cultivar N5909 a massa seca da parte aérea foi menor em relação as demais cultivares para todos os tratamentos aplicados, também na cultivar BMX tornado observou-se que nos tratamentos com glyphosate no tratamento de sementes, aplicação foliar e testemunha a massa da parte aérea das plantas de soja foram inferiores aos das cultivares RR2 (Figura 2B). Em A. Chateaubriand para as cultivares M5838 e N5909 a massa seca da parte aérea foi significativamente menor para os tratamentos com glyphosate no tratamento de sementes e aplicação foliar + tratamento de sementes em relação as cultivares M5917 e BMX tornado (Figura 2C).



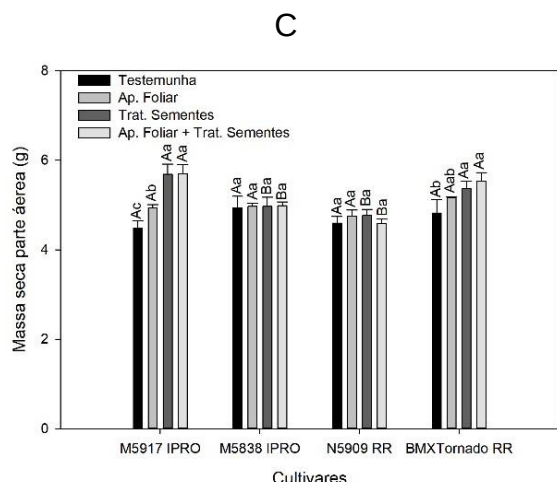


Figura 2. Massa seca da parte aérea das plantas dos cultivares de soja RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) após a aplicação de 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via tratamento de sementes, aplicação foliar e ambos nos municípios de Marechal Candido Rondon (A), Palotina (B) e Assis Chateaubriand (C) – PR. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras maiúsculas entre as cultivares e minúsculas iguais entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Em relação aos tratamentos dentre de cada cultivar para a variável massa da parte aérea das plantas de soja, observou-se que de maneira geral para as cultivares M5917 e BMX tornado que os tratamentos de glyphosate na aplicação foliar, tratamento de sementes e aplicação foliar + tratamento de sementes apresentam significativamente com mais massa da parte aérea em relação a testemunha sem aplicação nos três locais testados (Figura 2). Já para a cultivar M5838 no local de M.C. Rondon os tratamentos glyphosate no tratamento de sementes e aplicação foliar + tratamento de sementes, a produção de biomassa da parte área foi maior em relação a testemunha sem aplicação (Figura 2A), para os demais locais dos experimentos não foram observadas diferenças significativas para essa cultivar. Na cultivar N5909 somente no local Palotina foi observado incremento significativo da massa da parte aérea para todos os tratamentos com aplicação de glyphosate em relação a testemunha sem aplicação (Figura 2B).

A massa seca radicular das cultivares de soja apresentaram variação nos diferentes locais de condução do experimento. Em M.C. Rondon e A. Chateaubriand a testemunha da cultivar BMX tornado apresentou menor massa radicular quando

comparado a testemunhas das demais cultivares (Figura 3A). A cultivar N5909 apresentou menor massa de raiz em todos os tratamentos no local de A. Chateaubriand em relação as demais cultivares (Figura 3C). Em Palotina não foram observadas diferenças entre as cultivares (Figura 3B).

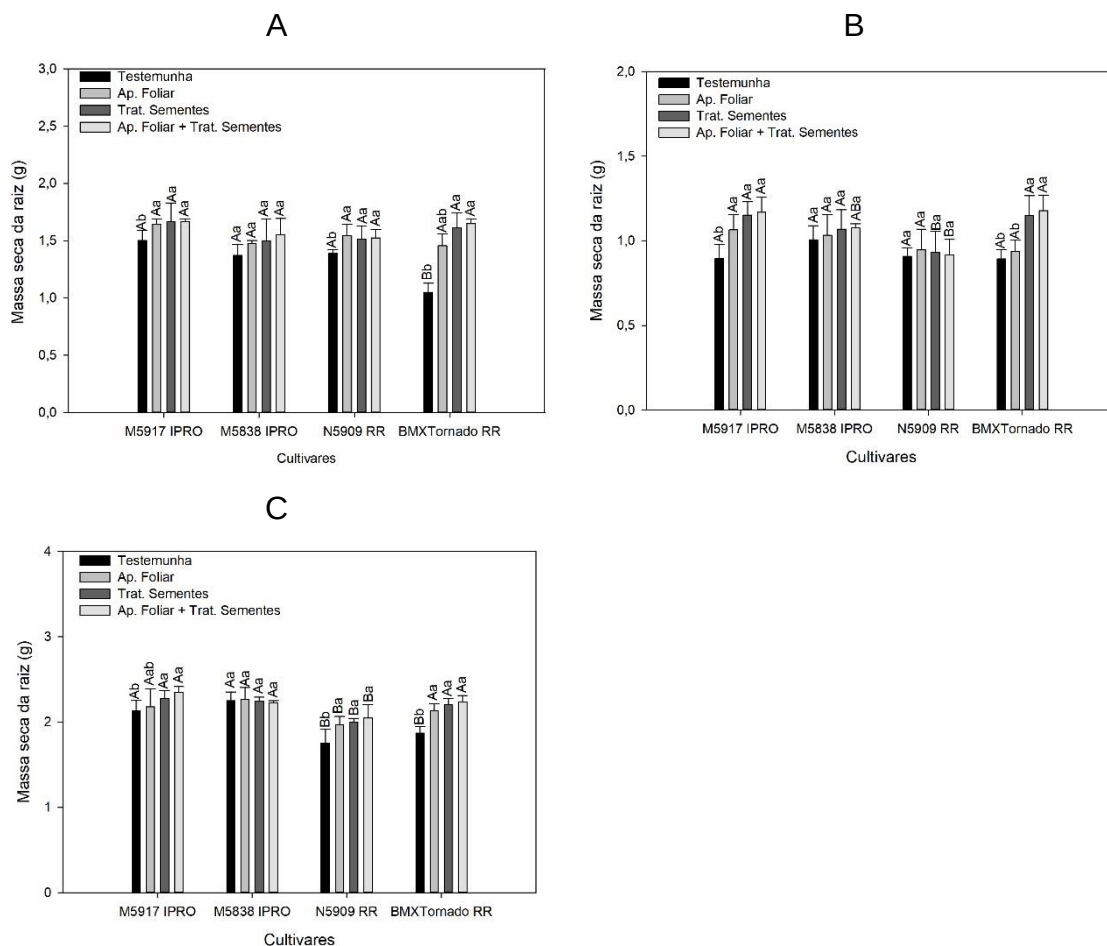
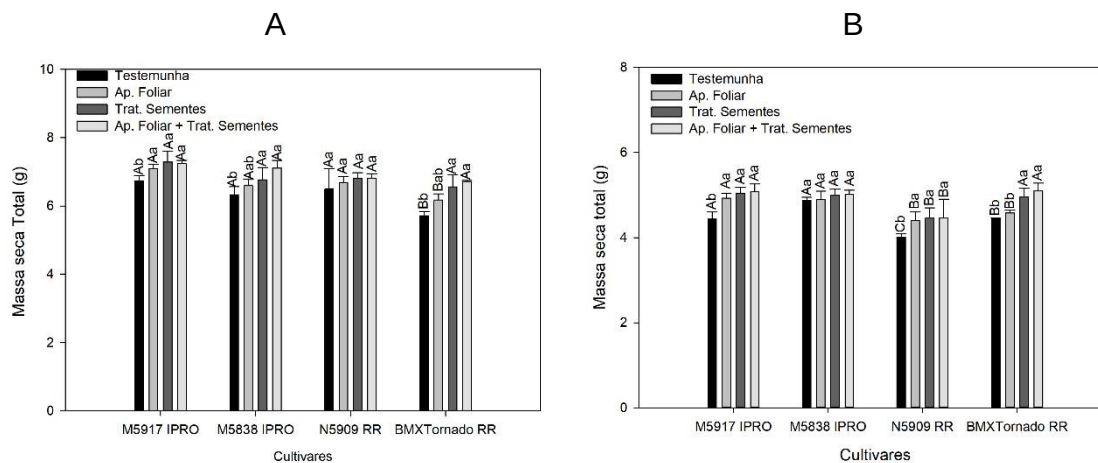


Figura 3. Massa seca da parte radicular das plantas dos cultivares de soja RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) após a aplicação de 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via tratamento de sementes, aplicação foliar e ambos nos municípios de Marechal Candido Rondon (A), Palotina (B) e Assis Chateaubriand (C) – PR. Média ± intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras maiúsculas iguais entre as cultivares e minúsculas entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T (p≤0,05).

Nos locais M.C. Rondon e A. Chateaubriand para as cultivares M5917, N5909 e BMX tornado os tratamentos com aplicação de glyphosate diferiram significativamente da testemunha sem aplicação. Nesses locais os tratamentos de glyphosate não influenciaram a produção de massa radicular em relação a

testemunha para a cultivar M5838 (Figura 3 AC). Em Palotina para a cultivar M5917 todos os tratamentos de glyphosate apresentaram diferença significativa em relação a testemunha sem aplicação. Na cultivar BMX tornado a aplicação de glyphosate no tratamento de sementes e no tratamento de sementes + aplicação foliar diferiram da testemunha sem aplicação e da aplicação de glyphosate no tratamento de sementes. Para as demais cultivares não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 3B).

Quando comparadas as cultivares nos locais M.C Rondon e Palotina observa-se que nos tratamentos testemunha e aplicação foliar foram significativamente menores na cultivar BMX tornado em relação aos demais cultivares na variável massa seca total das plantas de soja. Em Palotina a cultivar de soja N5909 apresentou menor massa seca total da planta diferiu significativamente dos demais cultivares independente do tratamento aplicado (Figura 4AB). Para o local de A. Chateaubriand a cultivar 5838 apresentou maior massa total na testemunha diferindo significativamente em relação as demais cultivares. Para as cultivares M5838 e N5909 nos tratamentos com aplicação de glyphosate, apresentaram menores valores de massa total em relação as demais cultivares (Figura 4C).



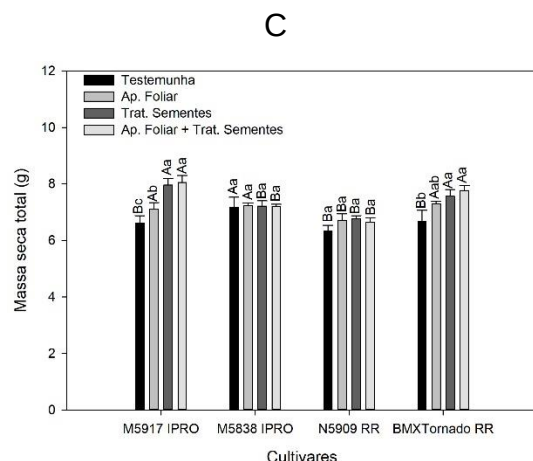


Figura 4. Massa seca total das plantas dos cultivares de soja RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) após a aplicação de 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via tratamento de sementes, aplicação foliar e ambos nos municípios de Marechal Candido Rondon (A), Palotina (B) e Assis Chateaubriand (C) – PR. Média ± intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras maiúsculas iguais entre as cultivares e minúsculas entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Os tratamentos com glyphosate aplicados via foliar, tratamento de sementes e aplicação foliar + tratamento de sementes, apresentaram maior acúmulo de biomassa em relação a testemunha sem aplicação, para as cultivares M5917, M5838 e BMX tornado no local de M.C. Rondon (Figura 4A). Em Palotina os tratamentos com aplicação de glyphosate incrementaram a massa seca total das plantas de soja nos cultivares M5917 e N5909 em relação a testemunha sem aplicação. Já para a cultivar BMX tornado a aplicação de glyphosate no tratamento de sementes e aplicação foliar + tratamento de sementes incrementaram a produção de biomassa em relação a testemunha sem aplicação (Figura 4B). Em A. Chateaubriand a aplicação de glyphosate no tratamento de sementes e no tratamento de sementes + aplicação foliar promoveu incremento de massa total das plantas de soja dos cultivares M5917 e BMX tornado em relação a testemunha sem aplicação (Figura 4C).

O número de nódulos apresentou diferença entre as cultivares estudadas. Para o local M.C Rondon o cultivar M5838 quando aplicado com o glyphosate, apresentou menor número de nódulos em relação aos demais cultivares (Figura 5A). Em Palotina o cultivar M5917 apresentou menor número de nódulos em relação as testemunhas das demais cultivares estudadas, porém com a aplicação de todos os tratamentos com

glyphosate fizeram esse cultivar a apresentar o maior número de nódulos em relação as demais cultivares de soja estudadas (Figura 5B). Em A. Chateaubriand a cultivar M5917 apresentou maior número de nódulos em relação as demais cultivares nos tratamentos de aplicação foliar de glyphosate e na testemunha sem aplicação, nos demais tratamentos não foram observadas diferenças significativas entre os cultivares (Figura 5C).

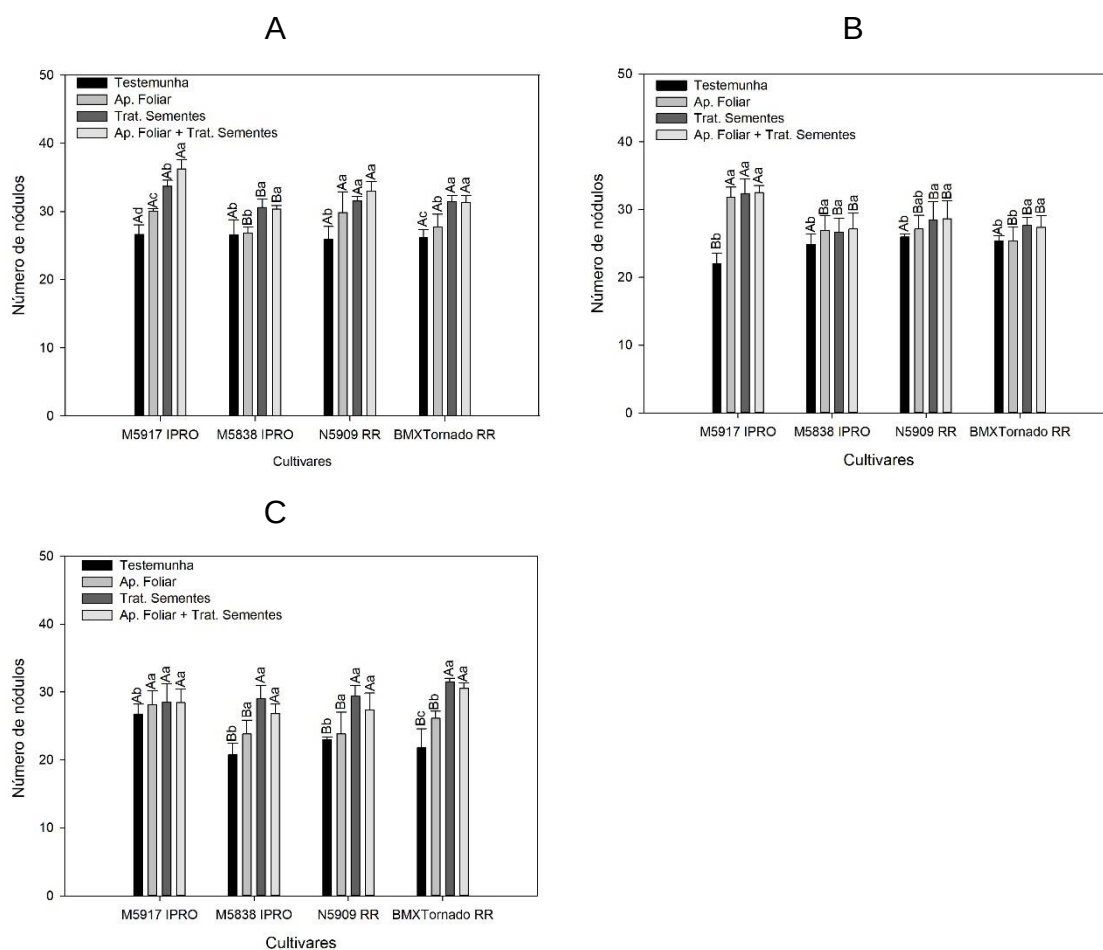
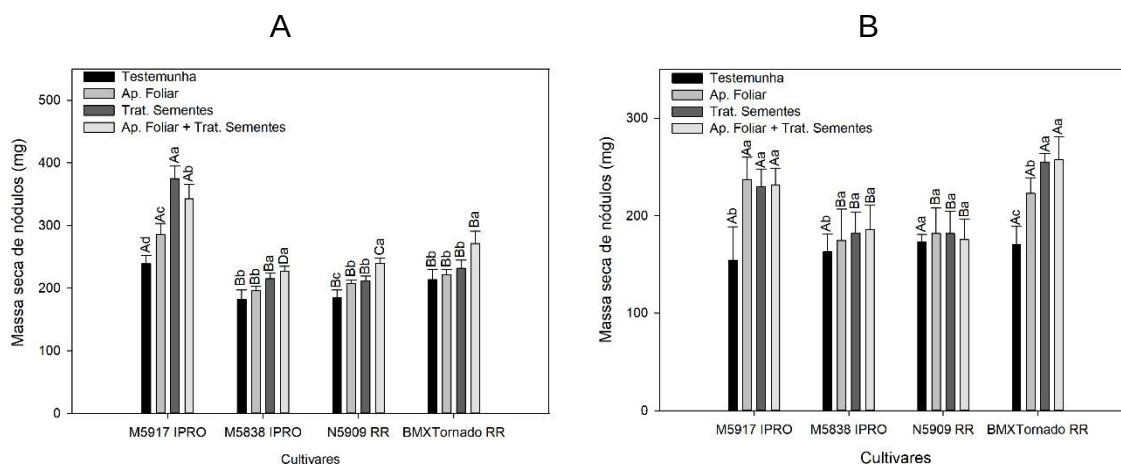


Figura 5. Número de nódulos dos cultivares de soja RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) após a aplicação de 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via tratamento de sementes, aplicação foliar e ambos nos municípios de Marechal Candido Rondon (A), Palotina (B) e Assis Chateaubriand (C) – PR. Média ± intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras maiúsculas iguais entre as cultivares e minúsculas entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T (p ≤ 0,05).

Quanto ao número de nódulos entre os tratamentos aplicados em cada cultivar no local M. C. Rondon, observou-se que para as cultivares M5838 e N5909 os tratamentos com aplicação de glyphosate no tratamento de sementes e tratamento de

sementes + aplicação foliar apresentaram maior número de nódulos em relação aos demais tratamentos. Para a cultivar M5917 o tratamento com aplicação de glyphosate no tratamento de sementes + aplicação foliar proporcionou maior número de nódulos em relação aos demais tratamentos. Para o cultivar N5909 todos os tratamentos com aplicação de glyphosate resultaram em maior número de nódulos em relação a testemunha sem aplicação (Figura 5A). Em Palotina os tratamentos com aplicação de glyphosate em todas as formas proporcionaram maior número de nódulos em relação a testemunha sem aplicação nas cultivares M5917, M5838 e N5909. Para a cultivar BMX tornado a aplicação de glyphosate no tratamento de sementes e tratamento de sementes + aplicação foliar apresentaram maior número de nódulos em relação aos demais tratamentos (Figura 5B). Para as cultivares RR e M5838 os tratamentos de glyphosate no tratamento de sementes e tratamento de sementes + aplicação foliar proporcionaram maior número de nódulos em relação aos demais tratamentos no local A. Chateaubriand. Para a cultivar M5917 todos os tratamentos com aplicação de glyphosate, apresentaram maior número de nódulos em relação a testemunha sem aplicação (Figura 5C).

Em relação a massa seca de nódulos observou-se que nos locais M.C. Rondon e A. Chateaubriand a cultivar M5917 apresentou maior massa de nódulos, diferindo significativamente, quando comparado as demais cultivares testadas nesse estudo (Figura 6AC). Em Palotina os cultivares de soja apresentaram comportamento semelhante na testemunha sem aplicação, porém com a aplicação dos tratamentos com glyphosate, as cultivares M5917 e BMX tornado a massa de nódulos foi significativamente maior em relação as demais cultivares (Figura 6B).



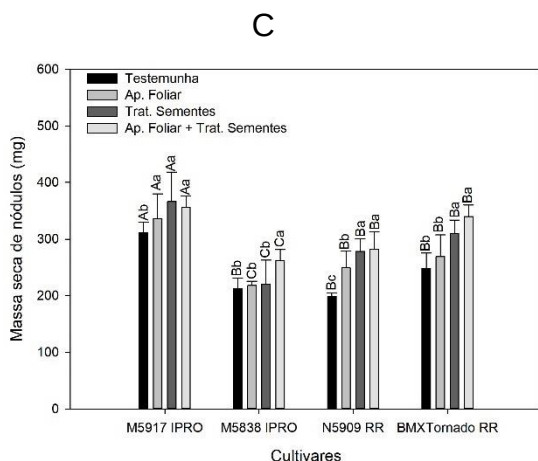


Figura 6. Massa seca de nódulos dos cultivares de soja RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) após a aplicação de 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via tratamento de sementes, aplicação foliar e ambos nos municípios de Marechal Candido Rondon (A), Palotina (B) e Assis Chateaubriand (C) – PR. Média ± intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras maiúsculas iguais entre as cultivares e minúsculas entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

O glyphosate aplicado no tratamento de sementes + aplicação foliar, proporcionou maior massa de nódulos nos cultivares M5838, N5909 e BMX tornado em relação aos demais tratamentos e a testemunha sem aplicação no local M.C. Rondon. Para a cultivar M5917 a maior massa de nódulos foi para o glyphosate no tratamento de sementes, diferindo significativamente dos demais tratamentos (Figura 6A). No experimento realizado em Palotina todos os tratamentos de glyphosate proporcionaram maior massa de nódulos para as cultivares de soja em relação a testemunha sem aplicação (Figura 6B). Em A. Chateaubriand para as cultivares M5917 e N5909 os tratamentos com aplicação de subdoses de glyphosate apresentaram maior massa de nódulos quando comparados a testemunha sem aplicação. Para a cultivar M5838 somente a aplicação de glyphosate no tratamento de sementes + aplicação foliar proporcionou maior massa de nódulos em relação a testemunha. Na cultivar BMX tornado os tratamentos com glyphosate no tratamento de sementes e no tratamento de sementes + aplicação foliar, diferiram significativamente dos demais tratamentos (Figura 6C).

Para os teores de N (nitrogênio) das plantas de soja, foram encontradas diferenças entre as cultivares. Em M.C Rondon a cultivar M5838 apresentou menor teor de N nos tratamentos com aplicação foliar e tratamento de sementes + aplicação

foliar de glyphosate em relação as cultivares M5917 e BMX tornado, na cultivar N5909 o teor de N também apresentou menor no tratamento de sementes + aplicação foliar de glyphosate em relação as demais cultivares (Figura 7A). Em Palotina e A. Chateaubriand não foram observadas diferenças entre as cultivares de soja estudadas (Figura 7BC). Em Botucatu o cultivar M5838 apresentou menor teor de N no tratamento com aplicação foliar de glyphosate, quando comparado ao mesmo tratamento das demais cultivares. Já a cultivar N5909 apresentou menor teor de N no tratamento de sementes e tratamento de sementes + aplicação foliar com glyphosate, quando comparado aos mesmos tratamentos nas demais cultivares (Figura 7D).

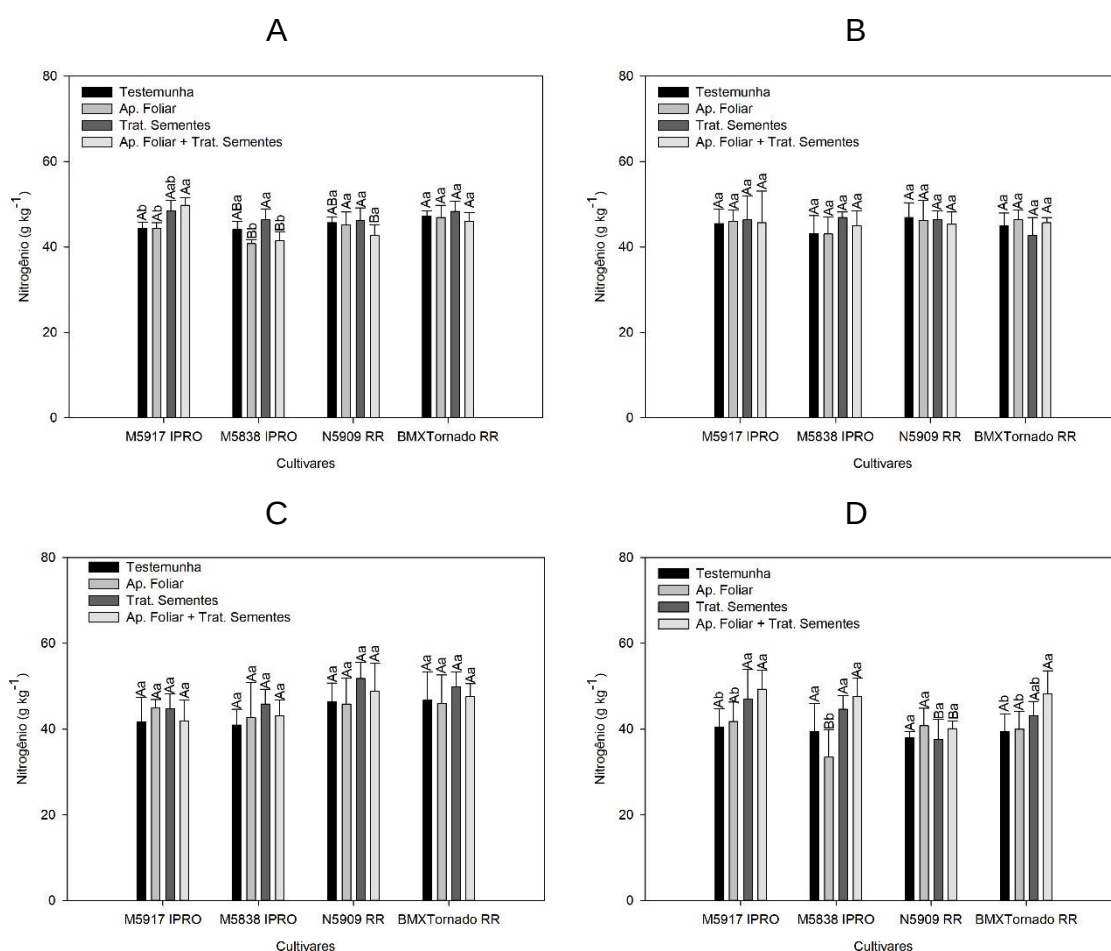
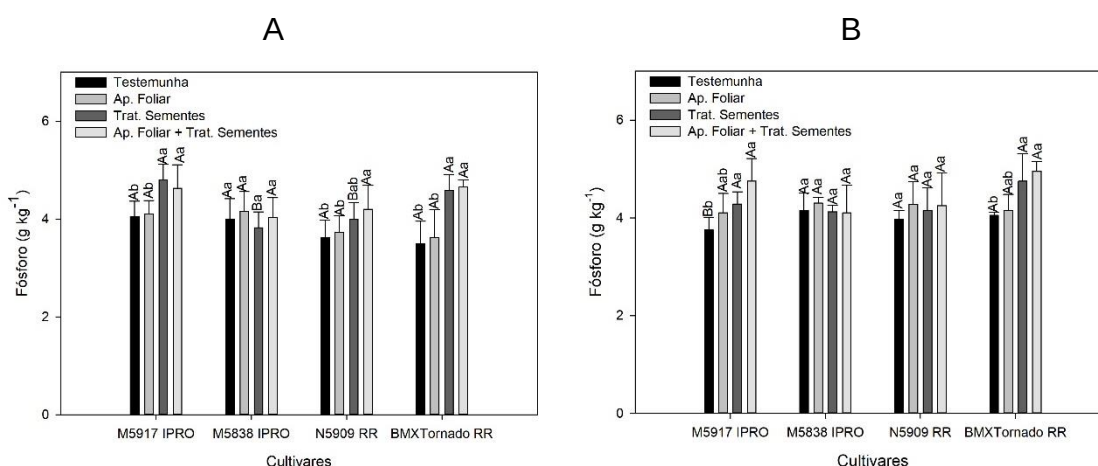


Figura 7. Teor de nitrogênio das plantas de soja dos cultivares RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) após a aplicação de 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via tratamento de sementes, aplicação foliar e ambos nos municípios de Marechal Candido Rondon (A), Palotina (B), Assis Chateaubriand (C) – PR e Botucatu (D) – SP. Média ± intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras maiúsculas iguais entre as cultivares e minúsculas entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T (p<0,05).

Os tratamentos com subdoses de glyphosate não afetaram os teores de N nas cultivares de soja estudadas para os locais Palotina e A. Chateaubriand (Figura 7BC). Para M.C. Rondon na cultivar M5917 o glyphosate aplicado no tratamento de sementes + aplicação foliar, apresentou maior teor de N em relação a testemunha e o tratamento com glyphosate com aplicação foliar. Na cultivar M5838 a testemunha e o glyphosate no tratamento de sementes apresentaram maior teor de N em relação aos demais tratamentos (Figura 7A). Em Botucatu para as cultivares M5917 e BMX tornado os teores de N foram significativamente maiores nos tratamentos com glyphosate no tratamento de sementes e tratamento de sementes + aplicação foliar, em relação aos demais tratamentos. Já para a cultivar M5838 o teor de N foi menor quando o glyphosate foi aplicado via foliar, quando comparado aos demais tratamentos (Figura 7D).

O teor de P (fósforo) variou conforme as cultivares de soja estudadas. Para o local M.C. Rondon o teor de P foi menor nas cultivares M5838 e N5909 para o tratamento de glyphosate no tratamento de sementes, quando comparado ao mesmo tratamento nas demais cultivares (Figura 8A). Em Palotina a testemunha da cultivar M5917 apresentou teor de P menor, em relação ao mesmo tratamento das demais cultivares de soja (Figura 8B). Não foram observadas diferenças significativas no teor de P entre as cultivares de soja em A. Chateaubriand (Figura 8C). Para Botucatu, observou-se que para a cultivar N5909 o teor de P foi menor para a testemunha quando comparado as cultivares RR2. Já a cultivar BMX tornado apresentou menor teor de P em todos os tratamentos aplicados quando comparada as demais cultivares estudadas (Figura 8C).



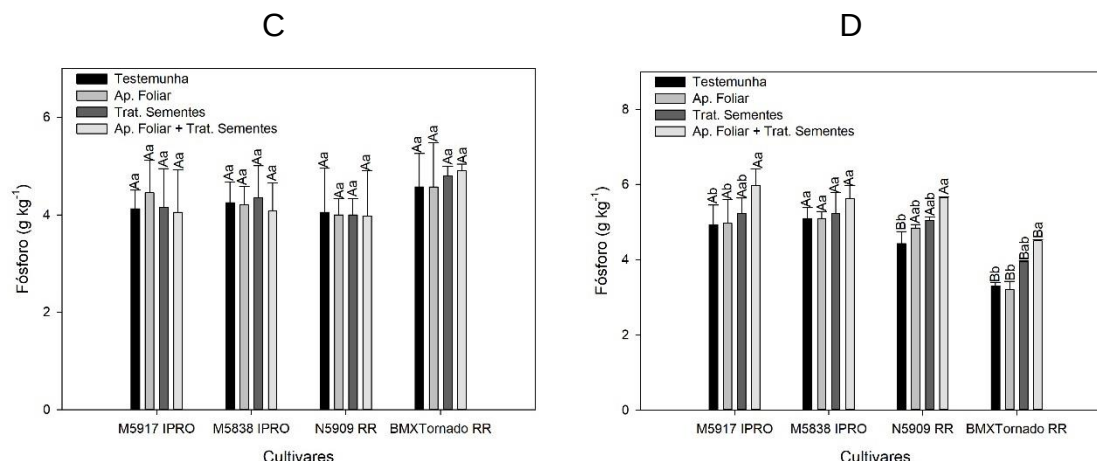


Figura 8. Teor de fósforo das plantas de soja dos cultivares RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) após a aplicação de 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via tratamento de sementes, aplicação foliar e ambos nos municípios de Marechal Candido Rondon (A), Palotina (B), Assis Chateaubriand (C) – PR e Botucatu (D) – SP. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras maiúsculas iguais entre as cultivares e minúsculas entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Em relação ao teor de P comparando os tratamentos, observa-se que em M.C. Rondon para as cultivares M5917, N5909 e BMX tornado, os tratamentos com glyphosate no tratamento de sementes e tratamento de sementes + aplicação foliar apresentaram maior teor de P quando comparado aos demais tratamentos (Figura 8A). Em Palotina novamente o glyphosate aplicado no tratamento de sementes e tratamento de sementes + aplicação foliar proporcionou maior teor de fósforo quando comparado aos demais tratamentos nas cultivares M5917 e BMX tornado (Figura 8B). Em A. Chateaubriand não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos estudados (Figura 8C). Em Botucatu a aplicação de glyphosate no tratamento de sementes + aplicação foliar, apresentou maior teor de P em relação a testemunha e aplicação foliar de glyphosate, nas cultivares M5917, N5909 e BMX tornado (Figura 8D).

Nos locais M.C. Rondon, A. Chateaubriand e Botucatu não foram observadas diferenças significativamente nos teores de K (Potássio) entre as cultivares de soja estudadas (Figura 9ACD). Já para Palotina a testemunha sem aplicação na cultivar M5917 apresentou menor teor de K em relação aos mesmos tratamentos das demais cultivares (Figura 9B). Em relação aos tratamentos observou-se que em M.C. Rondon

e Palotina os tratamentos com glyphosate no tratamento de sementes e tratamento de sementes + aplicação foliar apresentaram maior teor de K em relação aos demais tratamentos (Figura 9AB). Nos demais locais não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos estudados.

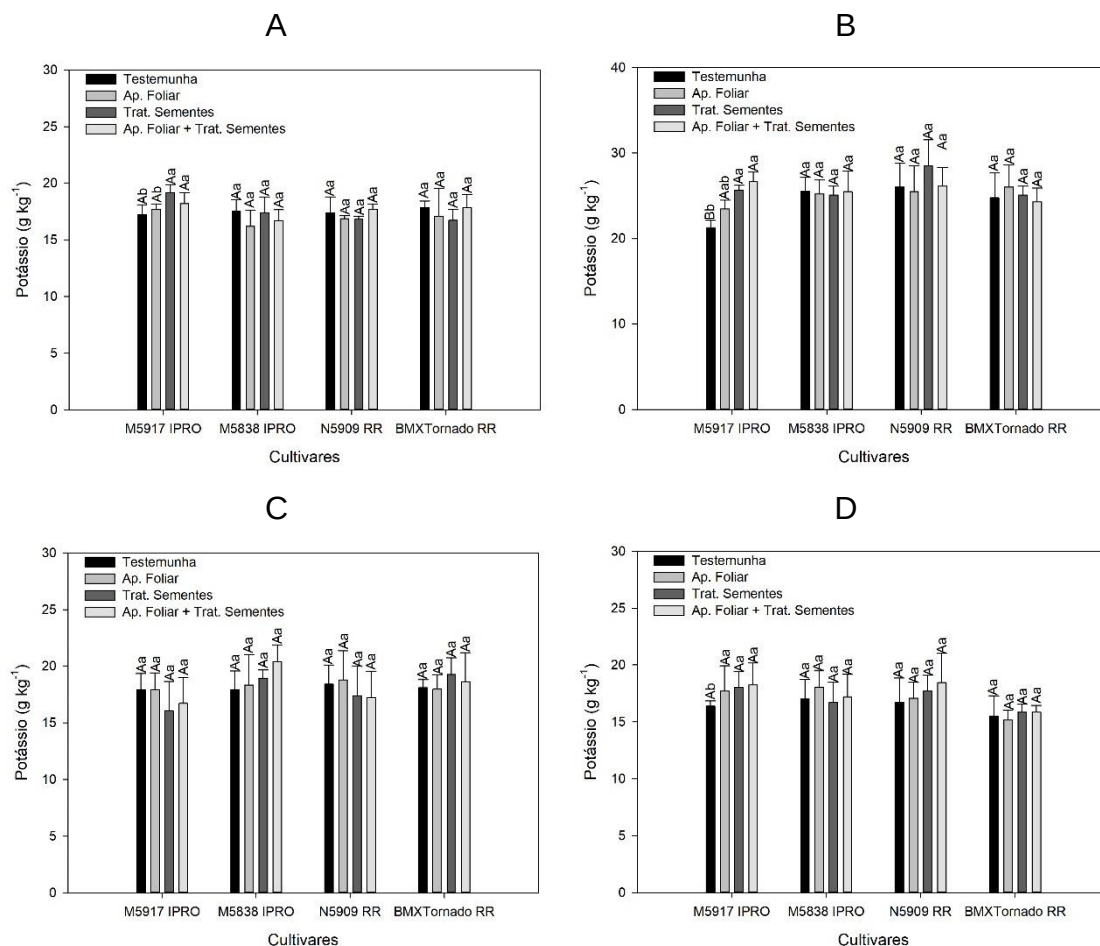


Figura 9. Teor de potássio das plantas de soja dos cultivares RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) após a aplicação de 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via tratamento de sementes, aplicação foliar e ambos nos municípios de Marechal Candido Rondon (A), Palotina (B), Assis Chateaubriand (C) – PR e Botucatu (D) – SP. Média ± intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras maiúsculas iguais entre as cultivares e minúsculas entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Não foram observadas diferenças significativas entre as cultivares de soja, independente dos locais dos experimentos, para os teores de Ca (cálcio) e Mg (magnésio) (Figura 10 e 11). Em relação aos tratamentos, os teores de Ca foram significativamente maiores quando se aplicou o glyphosate no tratamento de

sementes para a cultivar M5917, no local M.C. Rondon. Para os demais locais não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, para os teores de Ca (Figura 10). Para os teores de Mg não foram observadas diferenças significativas nos tratamentos independentemente do local estudado (Figura 11).

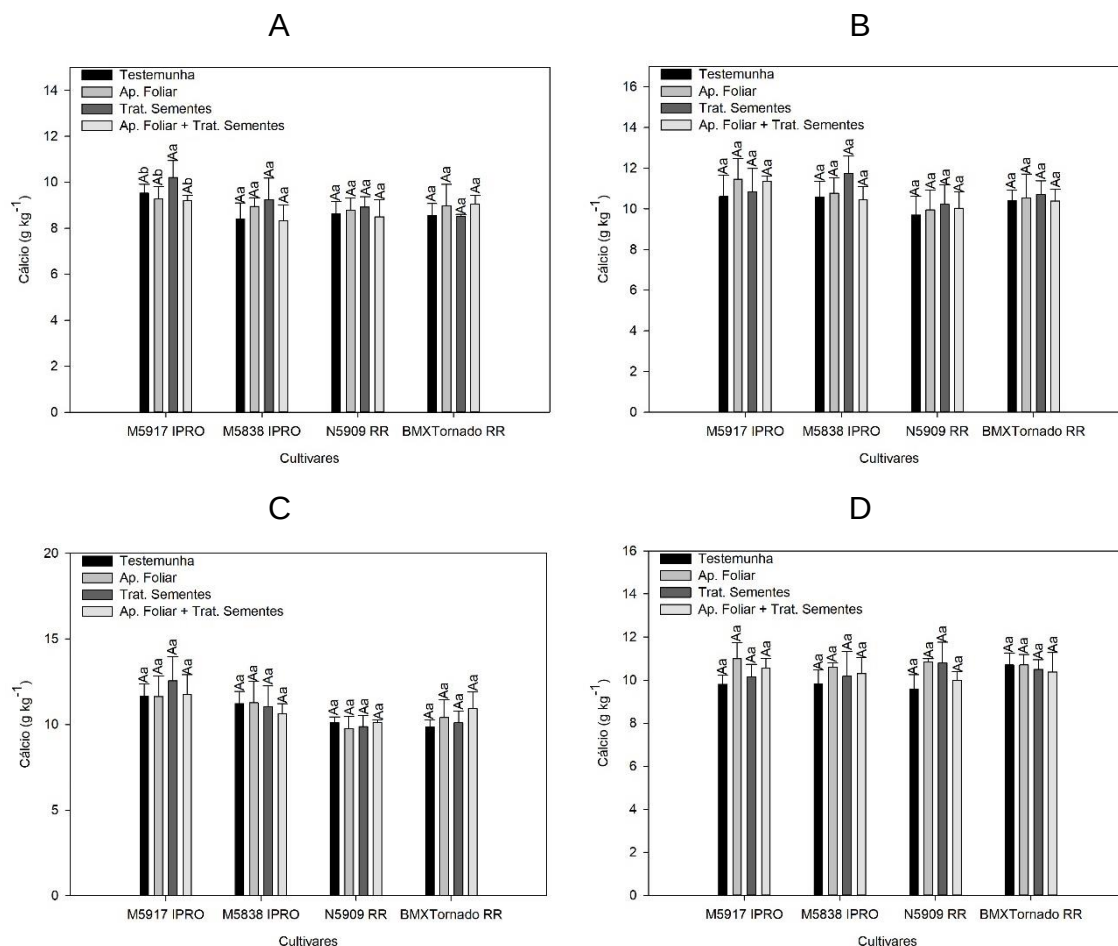


Figura 10. Teor de cálcio das plantas de soja dos cultivares RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) após a aplicação de 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via tratamento de sementes, aplicação foliar e ambos nos municípios de Marechal Candido Rondon (A), Palotina (B), Assis Chateaubriand (C) – PR e Botucatu (D) – SP. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras maiúsculas iguais entre as cultivares e minúsculas entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

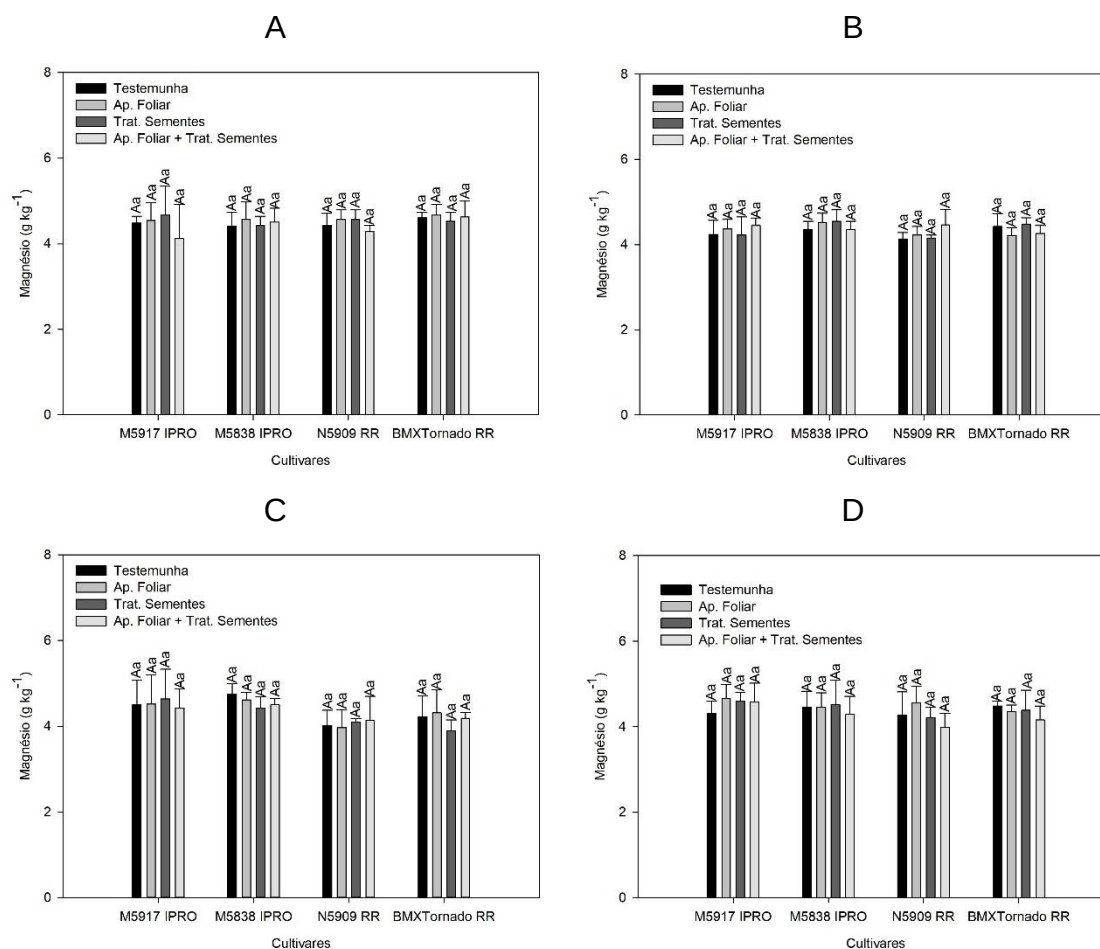


Figura 11. Teor de magnésio das plantas de soja dos cultivares RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) após a aplicação de 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via tratamento de sementes, aplicação foliar e ambos nos municípios de Marechal Cândido Rondon (A), Palotina (B), Assis Chateaubriand (C) – PR e Botucatu (D) – SP. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras maiúsculas iguais entre as cultivares e minúsculas entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Para os teores de S (enxofre), observou-se que para a cultivar M5838 apresentou menor teor de S em todos os tratamentos quando comparado as demais cultivares no local M.C. Rondon (Figura 12A). Nos locais Palotina e A. Chateaubriand não foram observadas diferenças significativas entre as cultivares de soja (Figura 12BC). Em Botucatu para a cultivar M5838 os tratamentos com glyphosate na aplicação foliar e tratamento de sementes apresentaram menor teor de S quando comparado ao mesmo tratamento das demais cultivares (Figura 12D). Quanto aos tratamentos observa-se que no local M.C. Rondon para as cultivares M5917 e N5909

observa-se que a aplicação de glyphosate no tratamento de sementes incrementou o teor de S, em relação a testemunha. Nos demais locais de realização dos experimentos os tratamentos não interferiram significativamente no teor de S (Figura 12).

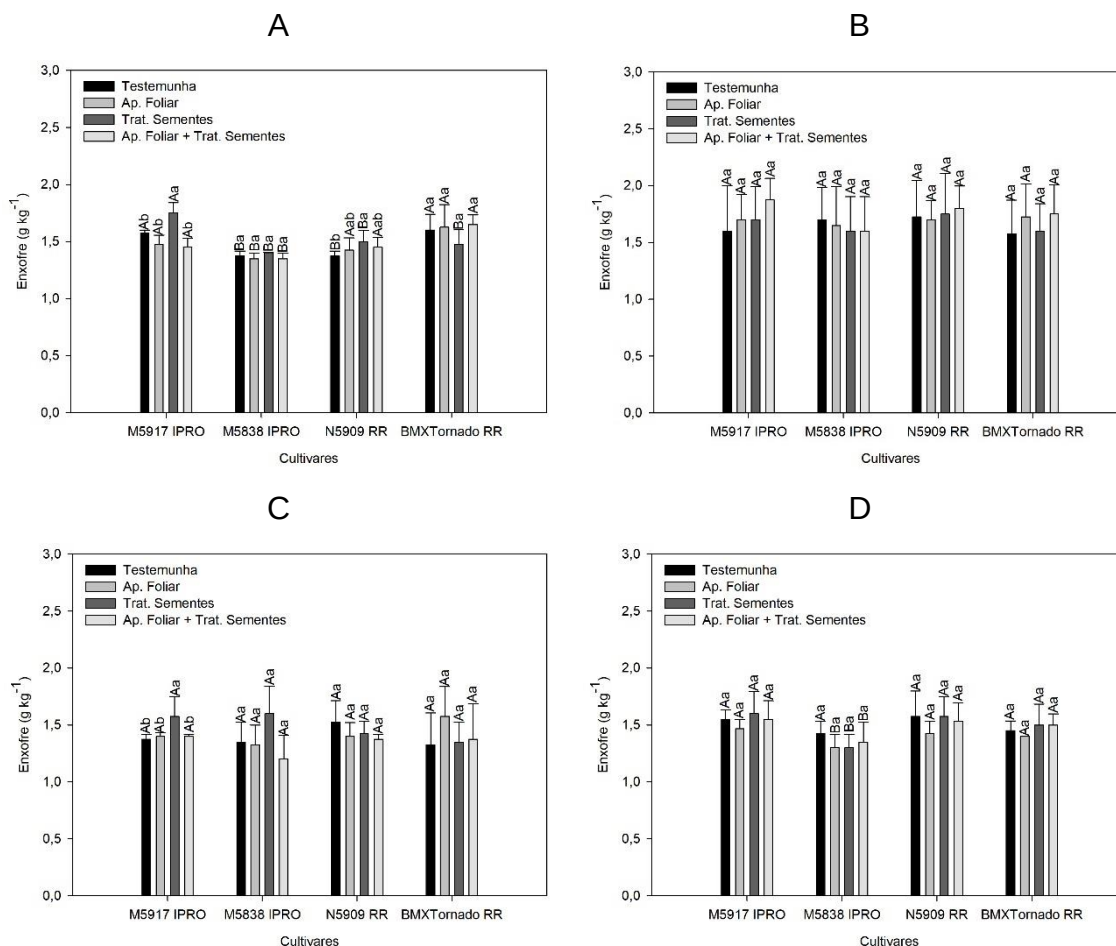


Figura 12. Teor de enxofre das plantas de soja dos cultivares RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) após a aplicação de 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via tratamento de sementes, aplicação foliar e ambos nos municípios de Marechal Candido Rondon (A), Palotina (B), Assis Chateaubriand (C) – PR e Botucatu (D) – SP. Média ± intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras maiúsculas iguais entre as cultivares e minúsculas entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T (p≤0,05).

Os teores de micronutrientes nas plantas de soja também foram afetados pela aplicação de glyphosate. Para o local M.C. Rondon e Botucatu observou-se que o teor de B (boro) apresentaram-se maior para a cultivar M5917 em todos os tratamentos quando comparado as demais cultivares (Figura 13AD). Já para o local Palotina, a

cultivar M5838 apresentou-se com teor de B maior que as demais cultivares em todos os tratamentos (Figura 13B). Em A. Chateaubriand as cultivares RR2, apresentaram maior teor de B em relação as cultivares RR em todos os tratamentos (Figura 13C). Quanto aos tratamentos, a aplicação de glyphosate no tratamento de sementes e tratamento de sementes + aplicação foliar, promoveu incremento nos teores de B nas cultivares M5917 e BMX tornado em relação aos mesmos tratamentos das demais cultivares no local M.C. Rondon (Figura 13A). Para o local Palotina, nas cultivares M5917, M5838 e BMX tornado a aplicação de glyphosate no tratamento de sementes e tratamento de sementes + aplicação foliar, promoveu incremento nos teores de B em relação a cultivar N5909 (Figura 13B). Em A. Chateaubriand para a cultivar N5909 a aplicação de glyphosate no tratamento de sementes + aplicação foliar apresentou maior incremento de B em relação aos demais tratamentos (Figura 13C). Já para Botucatu os tratamentos de glyphosate com tratamento de sementes e tratamento de sementes + aplicação foliar proporcionaram maior incremento de B em relação aos demais tratamentos (Figura 13D).

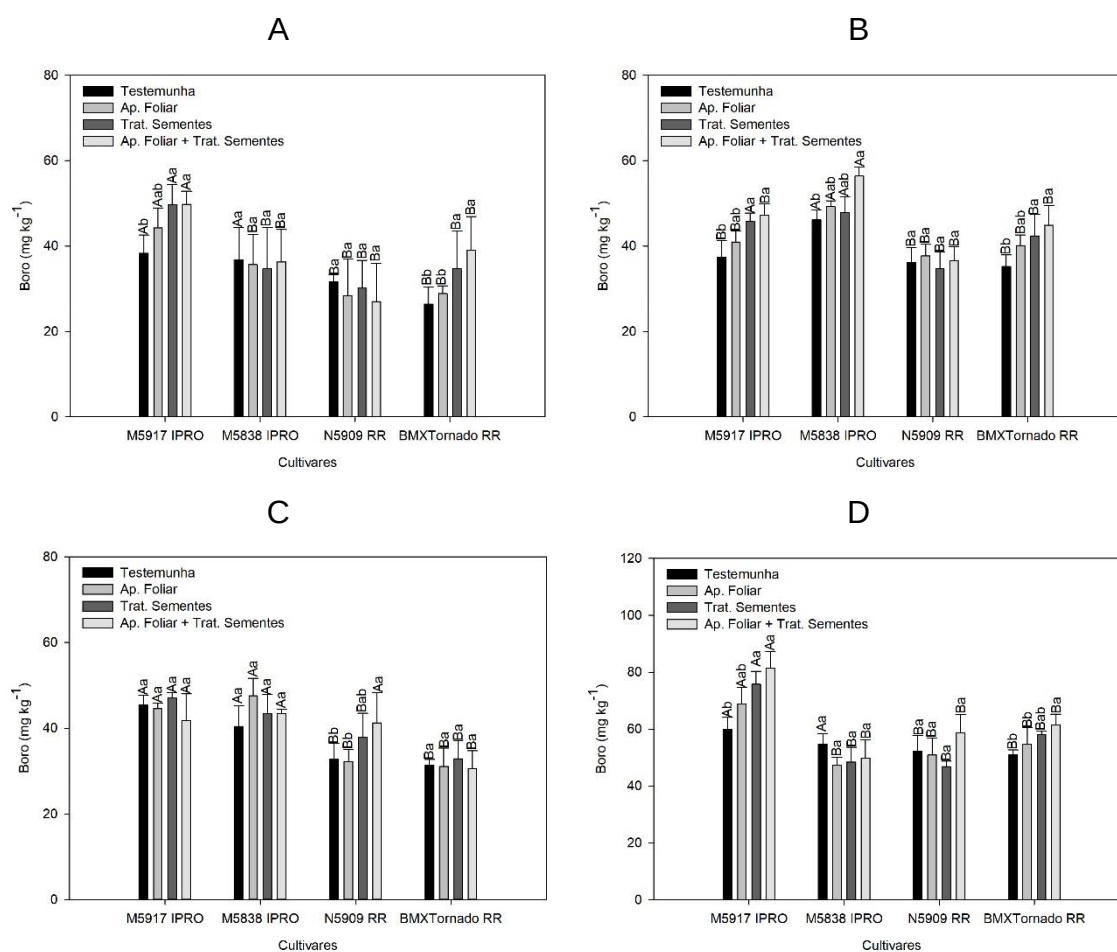


Figura 13. Teor de boro das plantas de soja dos cultivares RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) após a aplicação de 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via tratamento de sementes, aplicação foliar e ambos nos municípios de Marechal Candido Rondon (A), Palotina (B), Assis Chateaubriand (C) – PR e Botucatu (D) – SP. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras maiúsculas iguais entre as cultivares e minúsculas entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

A cultivar BMX tornado apresentou menor teor de Cu (cobre) no glyphosate no tratamento de sementes em relação as demais cultivares nesse mesmo tratamento, nos locais de M.C. Rondon e Botucatu. Não foram observadas outras diferenças entre as cultivares estudadas (Figura 14). Em relação aos tratamentos, observou-se que o teor de Cu foi maior para o glyphosate no tratamento de sementes para a cultivar M5917 em relação aos demais tratamentos para M.C. Rondon e A. Chateaubriand, não foram observadas outras diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 14).

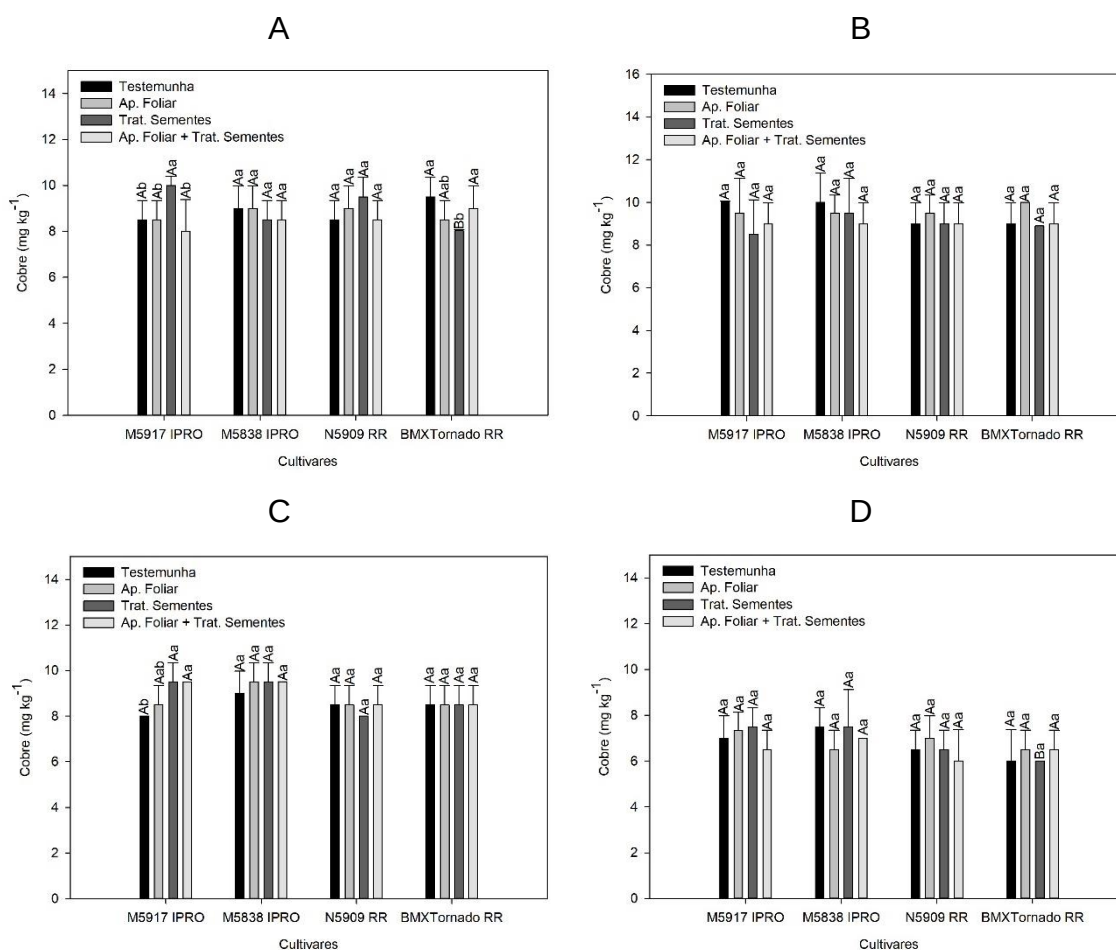
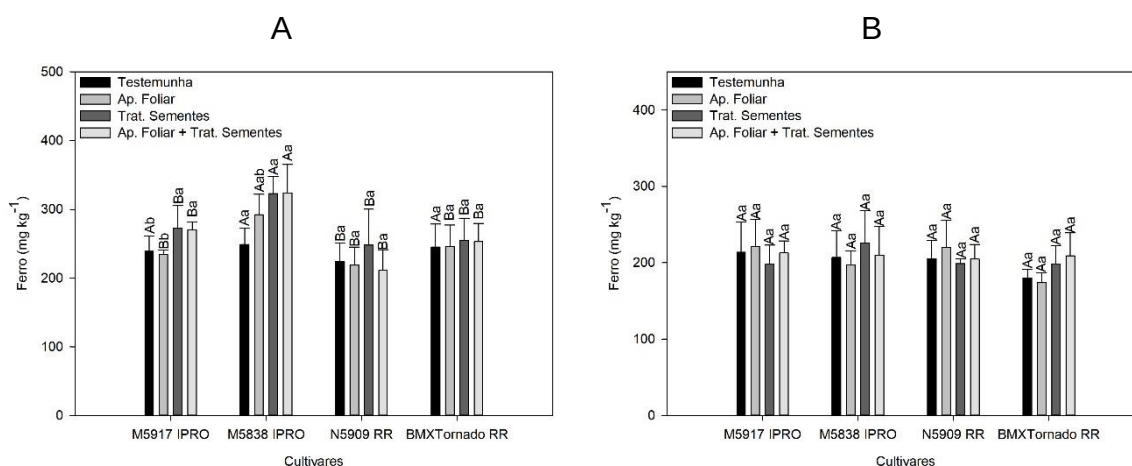


Figura 14. Teor de cobre das plantas de soja dos cultivares RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) após a aplicação de 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via tratamento de sementes, aplicação foliar e ambos nos municípios de Marechal Candido Rondon (A), Palotina (B), Assis Chateaubriand (C) – PR e Botucatu (D) – SP. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras maiúsculas iguais entre as cultivares e minúsculas entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Os teores de Fe (ferro), variam conforme as cultivares e entre os tratamentos. Em M.C. Rondon de maneira geral a cultivar M5838 apresentou os maiores teores de Fe em relação as demais cultivares, independente dos tratamentos realizados (Figura 15A). Já para o local A. Chateaubriand as cultivares RR2 apresentaram maior teor de Fe em relação as cultivares RR, independente do tratamento aplicado (Figura 15C). Em relação aos tratamentos, observou-se que os teores de Fe foram maiores com a aplicação de glyphosate no tratamento de sementes e tratamento de sementes + aplicação foliar, em relação a testemunha sem aplicação para os cultivares M5917 e M5838 no local M.C. Rondon (Figura 15A). Em A. Chateaubriand para a cultivar M5917 observou-se que os tratamentos de glyphosate no tratamento de sementes e tratamento de sementes + aplicação foliar apresentaram maiores teores de Fe em relação aos demais tratamentos. Para a cultivar N5909 o glyphosate no tratamento de sementes apresentou maior teor de Fe em relação aos demais tratamentos. Para a cultivar BMX tornado os tratamentos com glyphosate apresentaram maior teor de Fe em relação a testemunha sem aplicação (Figura 15C).



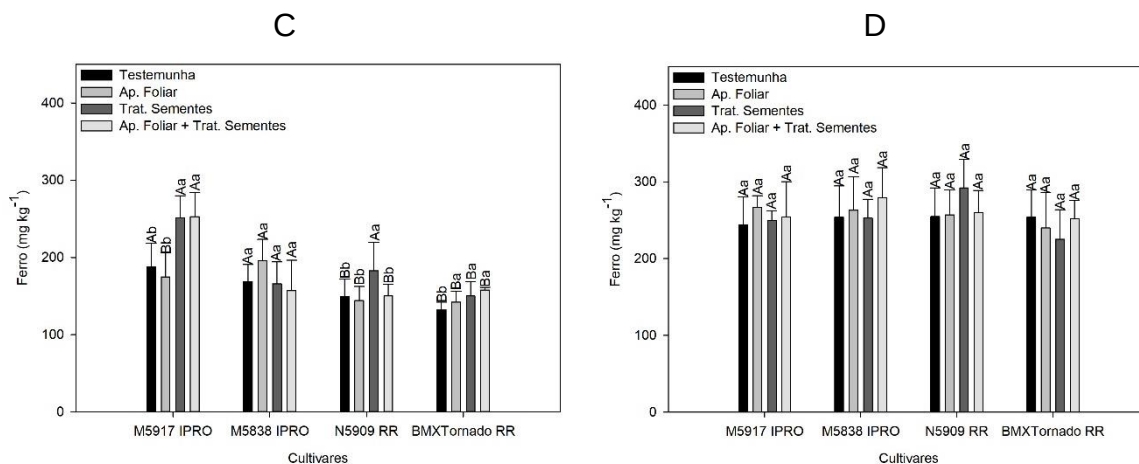
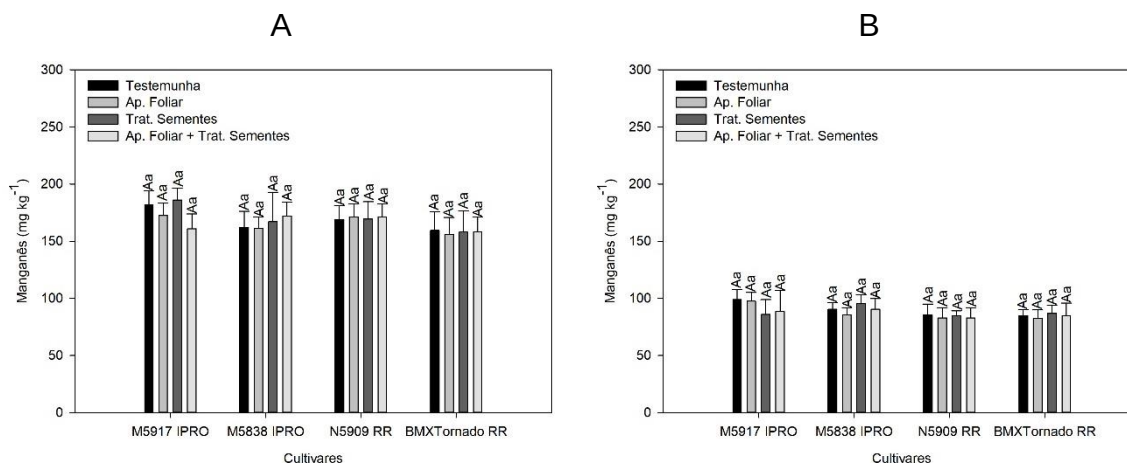


Figura 15. Teor de ferro das plantas de soja dos cultivares RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) após a aplicação de 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via tratamento de sementes, aplicação foliar e ambos nos municípios de Marechal Candido Rondon (A), Palotina (B), Assis Chateaubriand (C) – PR e Botucatu (D) – SP. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras maiúsculas iguais entre as cultivares e minúsculas entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Quanto aos teores de Manganês e Zinco não foram observadas diferenças significativas entre as cultivares de soja e os tratamentos com glyphosate aplicados, independentemente do local de realização dos experimentos (Figura 16 e 17).



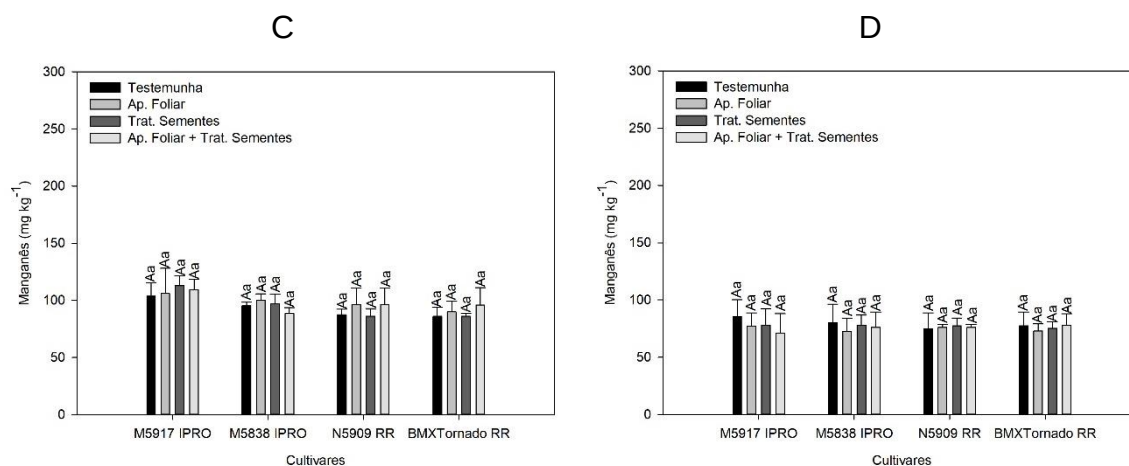
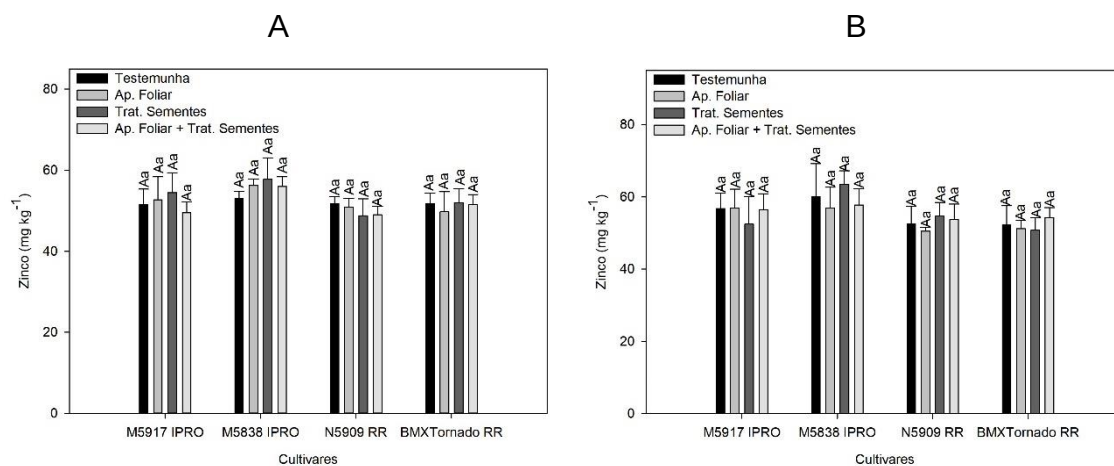


Figura 16. Teor de manganês das plantas de soja dos cultivares RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) após a aplicação de 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via tratamento de sementes, aplicação foliar e ambos nos municípios de Marechal Candido Rondon (A), Palotina (B), Assis Chateaubriand (C) – PR e Botucatu (D) – SP. Média ± intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras maiúsculas iguais entre as cultivares e minúsculas entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).



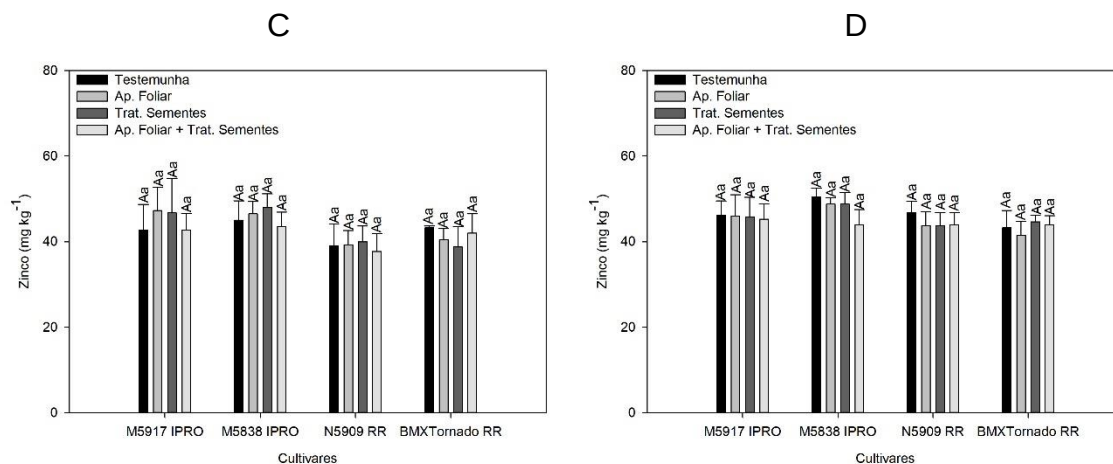


Figura 17. Teor de zinco das plantas de soja dos cultivares RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) após a aplicação de 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via tratamento de sementes, aplicação foliar e ambos nos municípios de Marechal Candido Rondon (A), Palotina (B), Assis Chateaubriand (C) – PR e Botucatu (D) – SP. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras maiúsculas iguais entre as cultivares e minúsculas entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

A altura de plantas de soja variou conforme as cultivares e os tratamentos utilizados. Em M.C. Rondon a cultivar BMX tornado apresentou maior altura final de plantas em relação a cultivar N5909 independente do tratamento utilizado. Em relação a cultivar M5838 a cultivar BMX tornado apresentou maior altura nos tratamentos com glyphosate na aplicação foliar e tratamento de sementes + aplicação foliar (Figura 18A). Em Palotina a cultivar BMX tornado no glyphosate aplicado no tratamento de sementes apresentou menor altura em relação as demais cultivares estudadas (Figura 18B). A cultivar BMX tornado apresentou maior altura final de plantas nos tratamentos com glyphosate em relação as demais cultivares em A. Chateaubriand (Figura 18C). Em Botucatu não foram observadas diferenças significativas entre as cultivares estudadas (Figura 18D).

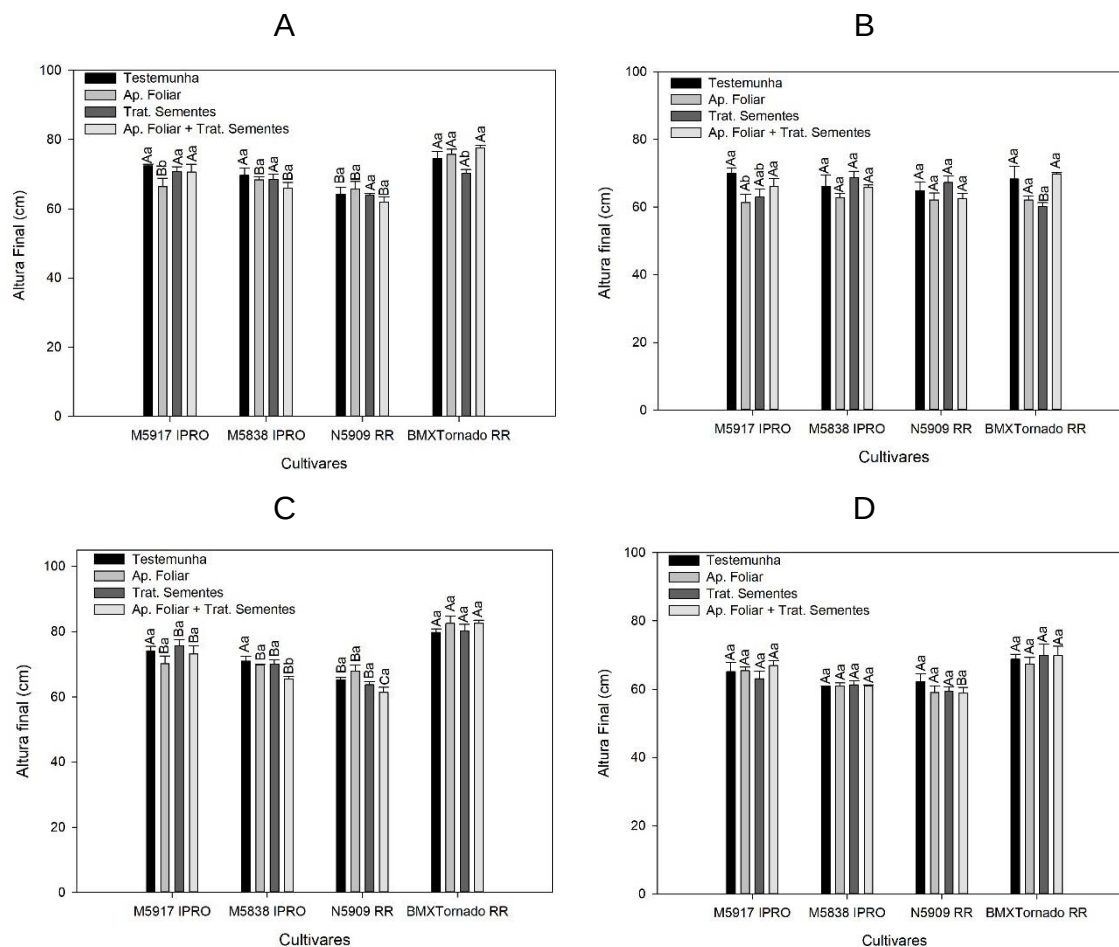
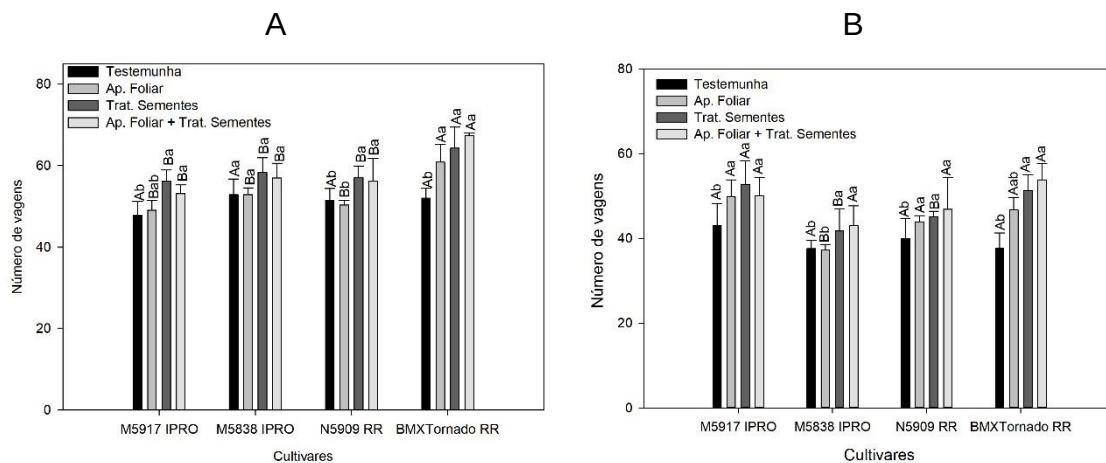


Figura 18. Altura final das plantas dos cultivares de soja RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) após a aplicação de 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via tratamento de sementes, aplicação foliar e ambos nos municípios de Marechal Cândido Rondon (A), Palotina (B), Assis Chateaubriand (C) – PR e Botucatu (D) - SP. Média ± intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras maiúsculas iguais entre as cultivares e minúsculas entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T (p≤0,05).

Em relação aos tratamentos observou-se que para a cultivar M5917 a aplicação de glyphosate foliar e para a cultivar BMX tornado o tratamento sementes com glyphosate reduziram a altura final de plantas quando comparado aos demais tratamentos em suas respectivas cultivares, no local de M.C. Rondon (Figura 18A). Em Palotina somente o tratamento com glyphosate na aplicação foliar reduziu a altura em relação aos demais tratamentos para a cultivar BMX tornado (Figura 18B). Para A. Chateaubriand a aplicação de glyphosate no tratamento + aplicação foliar reduziu a altura em relação aos demais tratamentos na cultivar M5838 (Figura 18C). Em

Botucatu não foram observadas diferenças significativas para altura final em relação aos tratamentos aplicados (Figura 18D).

Observou-se que a cultivar BMX tornado apresentou maior número de vagens em relação as demais cultivares nos tratamentos com aplicação de glyphosate em M.C. Rondon (Figura 19A). Em Palotina para a cultivar M5838 o tratamento com glyphosate na aplicação foliar apresentou menor número de vagens quando comparado as demais cultivares de soja. As cultivares M5838 e N5909 apresentaram menor número de vagens no tratamento de sementes com glyphosate em relação ao mesmo tratamento nas demais cultivares (Figura 19B). Em A. Chateaubriand a cultivar M5917 apresentou o menor número de vagens em relação as demais cultivares estudadas, independente do tratamento aplicado (Figura 19C). Para a testemunha sem aplicação as cultivares M5917 e N5909 apresentaram menor número de vagens em relação as demais cultivares em Botucatu. Para a cultivar BMX tornado o glyphosate aplicado no tratamento de sementes apresentou maior número de vagens em relação as demais cultivares. A cultivar M5917 apresentou menor número de vagens em relação as demais cultivares na aplicação de glyphosate no tratamento de sementes + aplicação foliar (Figura 19D).



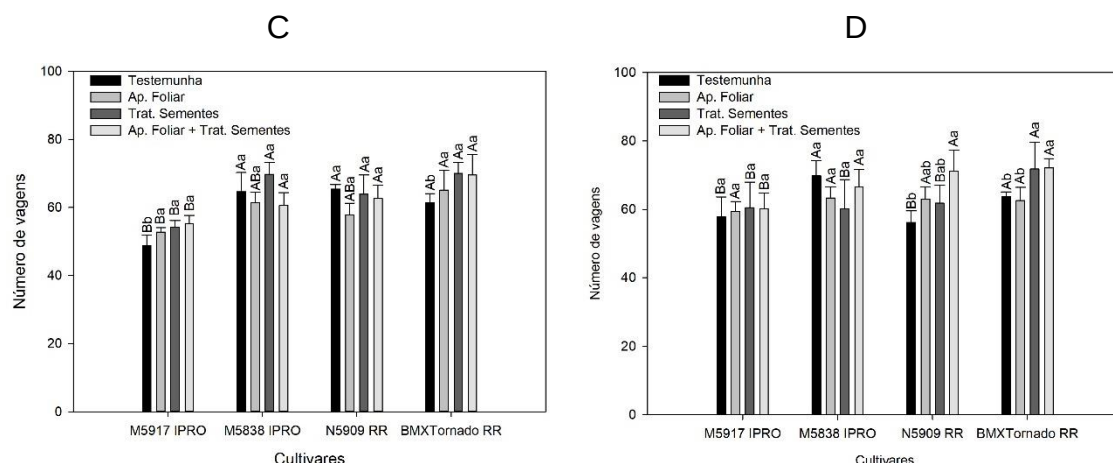


Figura 19. Número de vagens dos cultivares de soja RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) após a aplicação de 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via tratamento de sementes, aplicação foliar e ambos nos municípios de Marechal Candido Rondon (A), Palotina (B), Assis Chateaubriand (C) – PR e Botucatu (D) – SP. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras maiúsculas iguais entre as cultivares e minúsculas entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Em relação aos tratamentos observou-se que a aplicação de glyphosate no tratamento de sementes e tratamento de sementes + aplicação foliar apresentaram maior número de vagens em relação a testemunha sem aplicação, independente do cultivar, no local M.C. Rondon e Palotina (Figura 19AB). No local A. Chateaubriand os tratamentos com glyphosate apresentaram maior número de vagens para os cultivares M5917 e BMX tornado em relação a testemunha sem aplicação (Figura 19C). Em Botucatu para a cultivar N5909 aplicação de glyphosate no tratamento de sementes + aplicação foliar apresentou maior número de vagens em relação a testemunha sem aplicação. Já para a cultivar BMX tornado a aplicação de glyphosate no tratamento de sementes e tratamento de sementes + aplicação foliar apresentaram maior número de vagens diferindo significativamente da testemunha sem aplicação (Figura 19D).

No local M.C. Rondon e Botucatu a cultivar BMX tornado apresentou maior produtividade em relação aos demais cultivares nos tratamentos com aplicação de glyphosate (Figura 20AD). Para o local Palotina não foram observadas diferenças significativas entre as cultivares estudadas (Figura 20B). Em A. Chateaubriand a produtividade da cultivar M5838 para o tratamento testemunha foi significativamente maior em relação as cultivares M5917 e BMX tornado (Figura 20C).

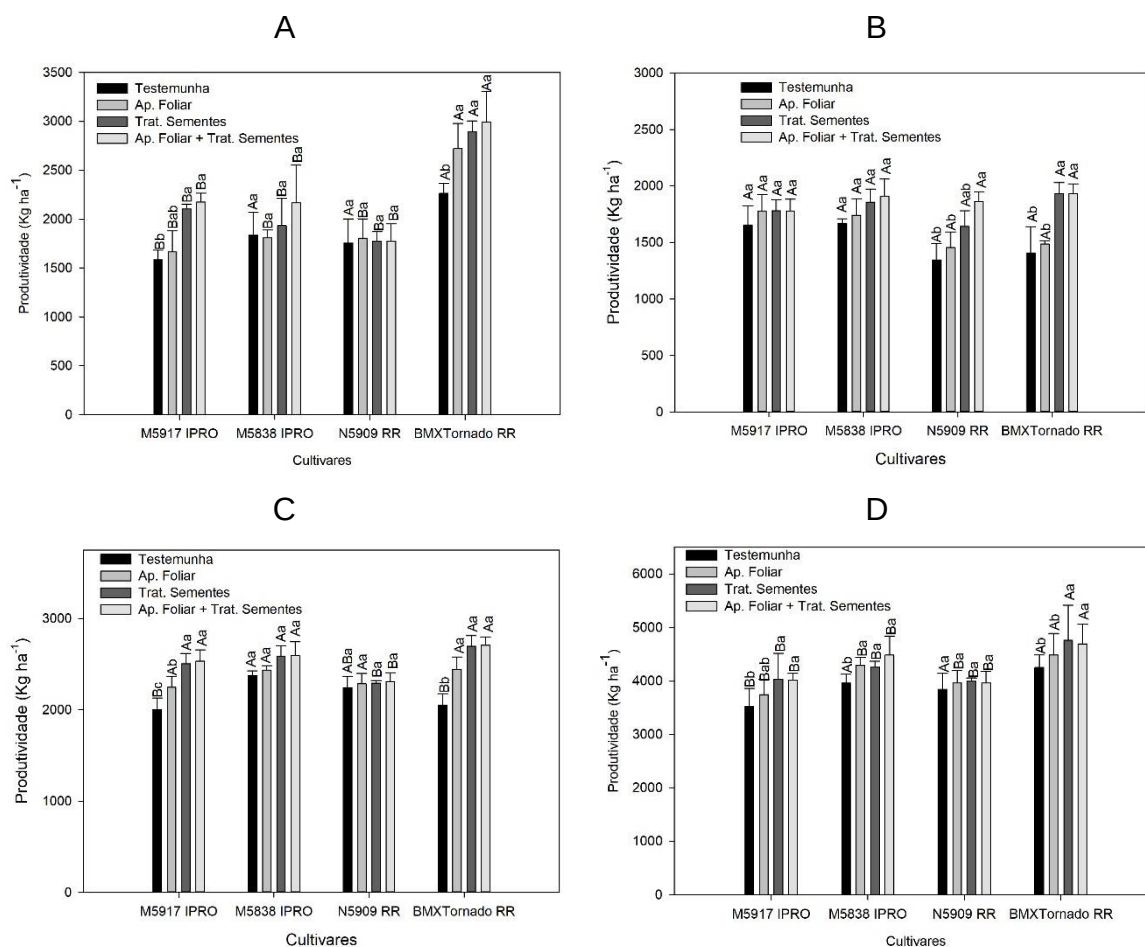


Figura 20. Produtividade dos cultivares de soja RR (BMX Tornado e N5909) e RR2 (M5917 IPRO e M5838 IPRO) após a aplicação de 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via tratamento de sementes, aplicação foliar e ambos nos municípios de Marechal Candido Rondon (A), Palotina (B), Assis Chateaubriand (C) – PR e Botucatu (D) – SP. Média $\pm$ intervalo de confiança (5% de probabilidade). Letras maiúsculas iguais entre as cultivares e minúsculas entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de média T ($p \leq 0,05$).

Quanto aos tratamentos observou-se que ocorreram incrementos no rendimento de grãos de grãos com a aplicação de glyphosate em relação a testemunha sem aplicação, para as cultivares M5917 e BMX tornado em M.C. Rondon. Para a cultivar M5917 e BMX tornado, ocorreram incrementos de 4 e 20% para o glyphosate na aplicação foliar, 33 e 20% para o glyphosate no tratamento de sementes e 33 e 32% para o glyphosate no tratamento de sementes + aplicação foliar, em relação a testemunha sem aplicação (Figura 20A). Para Palotina a aplicação de glyphosate no tratamento de sementes e tratamento de sementes + aplicação foliar

proporcionou incremento de produtividade para as cultivares RR. O incremento foi de 22 e 38% para a cultivar N5909, respectivamente para a aplicação de glyphosate no tratamento de sementes e tratamento de sementes + aplicação foliar. Para a cultivar BMX tornado o incremento foi de 37% para ambos os tratamentos (Figura 20B). Em A. Chateaubriand para as cultivares M5917 e BMX tornado ocorreram aumentos de produtividade em relação a testemunha sem aplicação. Para a cultivar M5917 e BMX tornado, ocorreram incrementos de 12 e 19% para o glyphosate na aplicação foliar, 24 e 31% para o glyphosate no tratamento de sementes e 26 e 32% para o glyphosate no tratamento de sementes + aplicação foliar, em relação a testemunha sem aplicação (Figura 20C). Em Botucatu ocorreram incrementos de produtividade em relação aos tratamentos, esses incrementos foram de 6, 8 e 5% para a aplicação foliar de glyphosate, 14, 7 e 11% para o tratamento de sementes com glyphosate e 13, 13 e 10% para o tratamento de sementes + aplicação foliar de glyphosate, respectivamente para as cultivares M5917, M5838 e BMX tornado (Figura 20D).

4.4 DISCUSSÃO

Quanto as condições climáticas, observou-se que para os três locais do estado do Paraná, ocorreram períodos com baixa precipitação hídrica e elevadas temperaturas (Figura 1), essas condições ocasionaram estresse hídrico por falta de água, resultando em perdas de produtividade da soja em relação ao local Botucatu – SP, no qual não foram observados períodos com restrição hídrica (Figura 20). Apesar de acontecerem perdas de produtividade pela restrição hídrica, observou-se que os tratamentos com glyphosate aumentaram a produtividade em alguns casos, isso pode estar relacionado a ação das subdoses de glyphosate atenuando os efeitos causados por estresse hídrico pela ativação de enzimas antioxidantes (SANTOS et al., 2022).

Conforme os dados de acúmulo de biomassa das plantas de soja, observou-se que para algumas cultivares os tratamentos com glyphosate no tratamento de sementes e aplicação foliar + tratamento de sementes promoveram incremento de biomassa massa, sendo esse direcionando para crescimento da parte aérea e radicular, demonstrando que há alocação de recursos por toda a planta com o estímulo gerado por esses tratamentos (CARVALHO et al., 2013). Esses recursos podem vir da redução dos teores de lignina após a aplicação de glyphosate, assim os

fotoassimilados antes destinados a produção de lignina são destinados a outras partes da planta (VELINI et al., 2008; DUKE et al., 2006).

A maior presença de raízes no solo promove maior absorção de nutrientes e água para a cultura da soja, pela maior exploração do solo (FOLONI et al., 2006; CAIRES et al., 2001). O maior crescimento radicular das plantas de soja encontrados nos tratamentos com glyphosate pode ter auxiliado na absorção de alguns nutrientes como o caso o fósforo (Figura 8) e ter auxiliado para as maiores produtividades encontradas principalmente nas áreas experimentais do estado do Paraná (Figura 20), onde ocorreram estresse por déficits hídricos (Figura 1). Ainda a maior massa radicular pode permitir que ocorram maiores níveis de nodulação na soja (ARAÚJO e HUNGRIA, 1999). Em trabalho realizado por NEPOMUCENO et al., (2017), quando a aplicação de subdose de glyphosate foi realizada em plântulas recém germinadas de soja, foram observados maior crescimento radicular e da parte aérea nas plantas aos 7 dias após a aplicação.

Geralmente a aplicação de altas doses de glyphosate estão associadas a redução da massa e número de nódulos em plantas de soja com o gene *cp4-epsps* em experimentos realizados em casa de vegetação (REDDY et al., 2001; ZOBIOLE et al., 2011; ZOBIOLE et al., 2012). Porém resultados de campo demonstram que as reduções da nodulação ou em outras variáveis da fixação biológica de nitrogênio não interferem na produtividade da soja (HERNANDEZ et al., 1999; HUNGRIA et al., 2014). Como foi observado nesse trabalho doses reduzidas (90 g e.a ha⁻¹) de glyphosate proporcionaram aumento do número de nódulos e sua massa quando aplicado a campo avaliado no florescimento aproximadamente 50 dias após a semeadura. Em simulação a campo de deriva de glyphosate em soja não resistente ao glyphosate a dose de 105 g e.a ha⁻¹ aumentou a massa de nódulos aos 70 dias após a semeadura, quando comparado a testemunha sem o tratamento (BELLALLOUI et al., 2006). Segundo MORANDI, (1989), subdoses de glyphosate favoreceram a colonização micorrízica de *Glomus mosseae* em soja, pela maior produção de isoflavonoídes.

Uma das possíveis causas da uma maior nodulação encontradas nesse trabalho seria pelo maior crescimento radicular das cultivares de soja quando aplicadas com subdoses de glyphosate (Figura 3) (ARAÚJO e HUNGRIA, 1999). Apesar de ocorrer maior nodulação não foram observados maiores níveis de nitrogênio nas plantas de soja (Figura 7). Diante dos resultados encontrados mais

estudos devem ser realizados para evidenciar os efeitos de subdoses de glyphosate na nodulação da soja.

A maior absorção de nutrientes como o fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro e ferro, pode estar ligado ao maior crescimento radicular encontrados em alguns tratamentos com subdose glyphosate, principalmente ligado ao glyphosate no tratamento de sementes em relação a testemunha. Com maior crescimento e desenvolvimento radicular da soja é possível explorar maior volume de solo e consequentemente de nutrientes nele presentes. Na cultura no feijão não foram observados diferença no teor de nutrientes foliar após a aplicação de subdoses de glyphosate (BERTOLHEIRO, 2019).

Um dos nutrientes mais afetados pela aplicação de subdoses de glyphosate foi o fósforo. Esse aumento nos níveis de fósforo após a aplicação de glyphosate está ligado a competição do grupo fosfato do glyphosate com o fósforo pelo transporte para dentro da célula nos transportadores de fosfato (BRECKE e DUKE, 1980; MERVOSH e BALKE, 1991). Com isso ocorre a sinalização de falta de fósforo pelas células desencadeado a expressão de genes de transportadores de fósforo altamente específicos (RUBIO et al., 2001; ROUACHED et al., 2010). Os genes altamente específicos são mais eficientes no transporte de fosforo na planta, assim favorecendo maior absorção e alocação desse nutriente dentro da planta (PEREIRA et al., 2019). Com isso as plantas de soja aplicadas com subdoses de glyphosate apresentam maior concentração de fósforo. Trabalhos com aplicação de sub doses de glyphosate também demonstraram que plantas de soja e eucalipto absorvem mais fósforo que nas plantas não tratadas (GODOY, 2007; PEREIRA et al., 2019). Porém em teste com deficiência de fósforo não foram encontradas respostas positivas de hormesis de glyphosate quando comparado a uma testemunha com teor alto de fósforo (CEDERGREEN et al., 2016), isso fortalece a hipótese de que a dinâmica do fósforo na planta pode ser um dos vários processos incrementados na hormesis. E a presença de fósforo no solo ou substrato pode determinar a presença ou ausência dos incrementos de crescimento da hormesis em plantas.

O número de vagens das plantas de soja é um dos principais componentes de produtividade da cultura. O número de vagens foi incrementado em praticamente todos os locais e cultivares, com a aplicação de glyphosate no tratamento de sementes e tratamento de sementes + aplicação foliar (Figura 19). Os mesmos tratamentos também apresentaram incremento de produtividade nas cultivares de soja estudadas

(Figura 20). A produtividade da soja não foi somente influenciada pelo aumento no número de vagens, mas sim devido a uma interação de fatores que foram afetados pelo efeito de estímulo da subdose do glyphosate, dentre elas pode-se destacar o maior acúmulo de biomassa (Figuras 2, 3 e 4), maior número e massa de nódulos (Figuras 5 e 6), em algumas situações maior concentração de macro e micronutrientes (Figuras 7-17). Todas essas alterações influenciam a produtividade positivamente. Demonstrando que é a complexa interação de fatores que causam o efeito de estímulo em plantas (BRITO et al., 2018; BELZ e DUKE, 2014; BELZ et al., 2011; VELINI et al., 2008). Na literatura até o momento não foram observados incrementos de produtividade de soja a campo pela aplicação de subdoses de glyphosate (BRITO et al., 2018). Na cultura da cana-de-açúcar subdoses de glyphosate incrementaram o teor de fósforo nas folhas, crescimento e produtividade (Pincelli-Souza et al., 2020).

Observou-se que ocorreram variações das cultivares de soja estudadas quanto as respostas a aplicação de subdoses de glyphosate. A interação cultivar x ambiente pode explicar essas respostas, pois nem todas as cultivares são adaptadas para os locais de condução dos ensaios. Além dessa complexa interação de cultivares x ambientes, também a outra complexa interação que promove o efeito de estímulo nas plantas, essa por sua vez está completamente ligada as condições ambientais, que quando favoráveis auxiliam as respostas fisiológicas que o efeito de estímulo pode provocar, sendo que algumas dessas respostas podem ser a tentativa de compensar o pequeno estresse químico gerado as plantas (CALABRESE, 2014; CALABRESE e MATTSON, 2011), redução dos teores de lignina e incremento de crescimento (VELINI et al., 2008), a maior absorção de fósforo (GODOY, 2007; PEREIRA et al., 2019), até mesmo a interação de todos os fatores acima listados promovendo o incremento de produtividade para cada cultivar dentro dos diferentes locais de estudos. Assim estudos podem ser realizados com as principais cultivares, cultivadas em determinadas regiões, para avaliar a efetividade das subdoses de glyphosate no tratamento de sementes e tratamento de sementes + aplicação foliar em proporcionar incrementos de produtividade.

Os melhores resultados apresentados na produtividade e outros fatores para o glyphosate aplicado no tratamento de sementes + aplicação foliar, pode estar ligado a uma pré-disposição ao glyphosate provocado pelo tratamento de sementes nas plantas de soja, assim quando a aplicação foliar é realizada potencializa-se as respostas a subdose do glyphosate. Em trabalho realizado por SILVA et al., (2016),

pré-dispondo plantas de soja a aplicação de subdoses de glyphosate encontraram que a soja apresentou maior estímulo com a pré-disposição quando comparado aos tratamentos sem pré-disposição. Em plantas de alface BELZ et al., (2011) encontraram maior resposta de incremento de crescimento radicular de alface por subdoses de glyphosate, quando as plantas foram pré-condicionadas a um pequeno estresse com metanol. Segundo CALABRESE et al., (2007) geralmente uma baixa dose de uma toxina reduz os efeitos tóxicos de maiores doses aplicadas posteriormente, chamando de hormesis condicionante. Isto pode explicar o fato de ocorrer estímulo de glyphosate nesse trabalho mesmo com uma aplicação em V4 de 720 g e.a ha⁻¹ de glyphosate, que potencialmente poderia causar redução de crescimento e produtividade (ALBRECHT et al., 2018; ALBRECHT et al., 2014). Assim pequenas doses de glyphosate podem condicionar as plantas de soja a metabolizar o glyphosate (SILVA et al., 2016; DUKE, 2011).

4.5 CONCLUSÕES

Frente aos resultados apresentados, a utilização do efeito de estímulo da aplicação de glyphosate para aumentar a produtividade da soja RR e RR2 pode ser utilizada a campo, principalmente com aplicação no tratamento de sementes e tratamento de sementes + aplicação foliar da dose de 90 g e.a ha⁻¹.

4.6 REFERÊNCIAS

- Albrecht AJP, Albrecht LP, Krenchinski FH, Placido HF, Lorenzetti JB, Victoria Filho R e Barroso AAM. Behavior of RR soybeans subjected to different formulations and rates of glyphosate in the reproductive period. *Planta Daninha* 32: 851-859 (2014).
- Albrecht AJ, Albrecht LP, Barroso AA, Cesco VJ, Krenchinski FH, Silva AF, Placido HF, Rodrigues DM, Filho RV. Glyphosate tolerant soybean response to different management systems. *Journal of Agricultural Science* 10: 204-216 (2018).
- Anunciato VM, Bianchi L, Gomes GLGC, Velini ED, Duke SO, Carbonari CA. Effect of low glyphosate doses on flowering and seed germination of glyphosate-resistant and -susceptible *Digitaria insularis*. *Pest Manage. Sci.* 78:1227-1239 (2021).
- Araújo FFD e Hungria M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/ *Bradyrhizobium elkanii*. *Pesquisa agropecuária brasileira* 34: 1633-1643 (1999).

- Bellaloui N, Reddy KN, Zablotowicz RM e Mengistu A. Simulated glyphosate drift influences nitrate assimilation and nitrogen fixation in non-glyphosate-resistant soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 3357-3364 (2006).
- Belz RG, Cedergreen N e Duke SO. Herbicide hormesis—can it be useful in crop production? *Weed Research* 51: 321-332 (2011).
- Belz RG e Duke SO. Herbicides and plant hormesis. *Pest management science* 70: 698-707 (2014).
- Bentley R The shikimate pathway – a metabolic tree with many branches. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 25: 307-384 (1990).
- Bertolheiro FPAP. Fotossíntese, concentração de nutrientes e produtividade do feijoeiro submetido à aplicação de subdoses de glyphosate. Tese (Doutorado em Agricultura). Faculdade de Ciências agrônômicas, Unesp, Botucatu – SP (2019).
- Brecke BJ e Duke WB. Effect of glyphosate on intact bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) and isolated cells. *Plant Physiology* 66: 656-659 (1980).
- Brito IP, Tropaldi L, Carbonari CA e Velini ED. Hormetic effects of glyphosate on plants. *Pest management Science* 74: 1064-1070 (2018).
- Caires EF, Fonseca AF, Feldhaus IC, e Blum J. Crescimento radicular e nutrição da soja cultivada no sistema plantio direto em resposta ao calcário e gesso na superfície. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 25: 1029-1040 (2001).
- Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ. Biological stress response terminology: integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose–response framework. *Toxicology and applied pharmacology* 222: 122-128 (2007).
- Calabrese EJ. Hormesis: from mainstream to therapy. *Journal of Cell Commun Signal* 8: 289-291 (2014).
- Calabrese EJ, Mattson MP. Hormesis provides a generalized quantitative estimate of biological plasticity. *Journal of Cell Commun Signal* 5: 25-38 (2011).
- Carvalho LB, Alves PL, Duke SO. Hormesis with glyphosate depends on coffee growth stage. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 85: 813-822 (2013).
- Cedergreen N, Hansen NK e Arentoft BW. The influence of nitrogen and phosphorous status on glyphosate hormesis in *Lemna minor* and *Hordeum vulgare*. *European journal of agronomy* 73:107-117 (2016).
- Céleres. Cultivo de soja no Brasil. Disponível em: <http://www.celeres.com.br/>. Acessado em: 18 de janeiro de 2020.

Cesb. Publicações. Disponível em: <http://www.cesbrasil.org.br/publicacoes/>. Acessado em: 20 de fevereiro de 2022.

Cesco VJS. Hormesis de glyphosate no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de biótipos de *conyza* spp. Dissertação (Mestrado em Agricultura). Faculdade de Ciências agrônômicas, Unesp, Botucatu – SP (2018).

Conab. Sétimo levantamento da safra de grãos. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>.

Acessado em: 20 de fevereiro de 2022.

Ctnbio. Liberação comercial de plantas de milho. Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial#/liberacao-comercial/consultar-processo>.

Acessado em: 21 de fevereiro de 2022.

Dill GM, Cajacob CA e Padgett SR. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. *Pest Management Science* 64: 326-331 (2008).

Duke SO. Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and-susceptible crops and weeds. *Journal of agricultural and food chemistry* 59: 5835-5841 (2011).

Duke SO, Cedergreen N, Velini ED e Belz RG. Hormesis: is it an important factor in herbicide use and allelopathy? *Outlooks on Pest Management* 17: 29-33 (2006).

Foloni JSS, Lima, SLD e Büll LT. Crescimento aéreo e radicular da soja e de plantas de cobertura em camadas compactadas de solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 30: 49-57 (2006).

Franz JE, Mao MK, Sikorski JA. Glyphosate: a unique global herbicide. *American Chemical Society* (1997).

Godoy MC. Efeitos do glyphosate sobre o crescimento e absorção de fósforo em soja. Dissertação (Mestrado em Agricultura). Faculdade de Ciências agrônômicas, Unesp, Botucatu – SP. (2007).

Gomes GLGC. Caracterização bioquímica e morfofisiológica de populações de buva (*conyza* spp.) resistentes ao glyphosate. Tese (Doutorado em Agricultura). Faculdade de Ciências agrônômicas, Unesp, Botucatu – SP. (2014)

Green JM. The rise and future of glyphosate and glyphosate-resistant crops. *Pest management science* 74: 1035-1039 (2018).

Hernandez A, Garcia-Plazaola JI e Becerril, J. M. Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 2920-2925 (1999).

- Hungria M, Mendes IC, Nakatani AS, dos Reis-Junior FB, Morais JZ, de Oliveira MC N e Fernandes MF. Effects of the glyphosate-resistance gene and herbicides on soybean: Field trials monitoring biological nitrogen fixation and yield. *Field Crops Research* 158: 43-54 (2014).
- Malavolta EA., Vitti GC, Oliveira SA. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba, POTAFOS (1997).
- Mervosh TL e Balke NE. Effects of calcium, magnesium, and phosphate on glyphosate absorption by cultured plant cells. *Weed Science* 39: 347-353 (1991)
- Morandi D. Effect of xenobiotics on endomycorrhizal infection and isoflavonoid accumulation in soybean roots. *Plant physiology and biochemistry* 27: 697-701 (1989).
- Nascentes RF, Carbonari CA, Simões PS, Brunelli MC, Velini ED, Duke SO. Low doses of glyphosate enhance growth, CO₂ assimilation, stomatal conductance and transpiration in sugarcane and eucalyptus. *Pest managem. Scie.* 74: 1197-1205 (2018).
- Nepomuceno M, Chinchilla N, Varela RM, Molinillo JM, Lacret R, Alves PL e Macias FA. Chemical evidence for the effect of Urochloa ruziziensis on glyphosate-resistant soybeans. *Pest management science* 73: 2071-2078 (2017).
- Pincelli-Souza RP, Bortolheiro FP, Carbonari CA, Velini ED e Silva, MA. Hormetic effect of glyphosate persists during the entire growth period and increases sugarcane yield. *Pest Management Science* 76: 2388–2394 (2020).
- Reddy KN, Hoagland RE, Zablotowicz RM. Effect of glyphosate on growth, chlorophyll, and nodulation in glyphosate-resistant and susceptible soybean (*Glycine max*) varieties. *Journal of New Seeds* 2:37-52 (2001).
- Reuters. Cultivo de soja no Brasil. Disponível em: <https://br.reuters.com/>. Acessado: 18 de fevereiro de 2022.
- Rouached H, Arpa AB, Poirier Y. Regulation of phosphate starvation responses in plants: signaling players and cross-talks. *Molecular Plant* 3: 288– 299 (2010).
- Rubio V, Linhares F, Solano R, Martin AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes & Development* 15: 2122–2133 (2001).
- Santos JCC, Silva DMR, Amorim DJ, do Rosário Rosa V, Dos Santos ALF, Velini, ED, Carbonari CA e de Almeida Silva, M.. Glyphosate hormesis attenuates water deficit stress in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) by modulating physiological and biochemical mediators. *Science of The Total Environment* 810:152204 (2022).

Silva FML, Duke SO, Dayan FE e Velini ED. Low doses of glyphosate change the responses of soyabean to subsequent glyphosate treatments. *Weed Research* 56: 124-136 (2016).

Usda. Crop production. Disponível em: <https://www.usda.gov/topics/farming/crop-production>. Acessado em: 20 de fevereiro de 2021.

Velini ED, Alves E, Godoy MC, Meschede DK, Souza RT e Duke SO. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. *Pest Managem. Scie.* 64: 489-496 (2008).

Zobiole LHS, Kremer RJ., de Oliveira Jr RS e Constantin J. Glyphosate effects on photosynthesis, nutrient accumulation, and nodulation in glyphosate-resistant soybean. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 175: 319-330 (2012).

Zobiole LH, Kremer RJ, Oliveira Jr RS e Constantin J. Glyphosate affects chlorophyll, nodulation and nutrient accumulation of "second generation" glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99: 53-60, 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação de subdoses de glyphosate pode ser realizado no tratamento de sementes de soja, pois as plantas apresentam incremento de desenvolvimento e crescimento e produtividade. Os teores de fósforo, lignina e dos componentes da rota do ácido chiquímico, bem como as vias enriquecidas encontradas por RNAseq estão envolvidos com o estímulo de subdoses de glyphosate em cultivares de soja NR, RR e RR2. Assim a somatória desses fatores é responsável pelo efeito de estímulo em soja.

REFERÊNCIAS

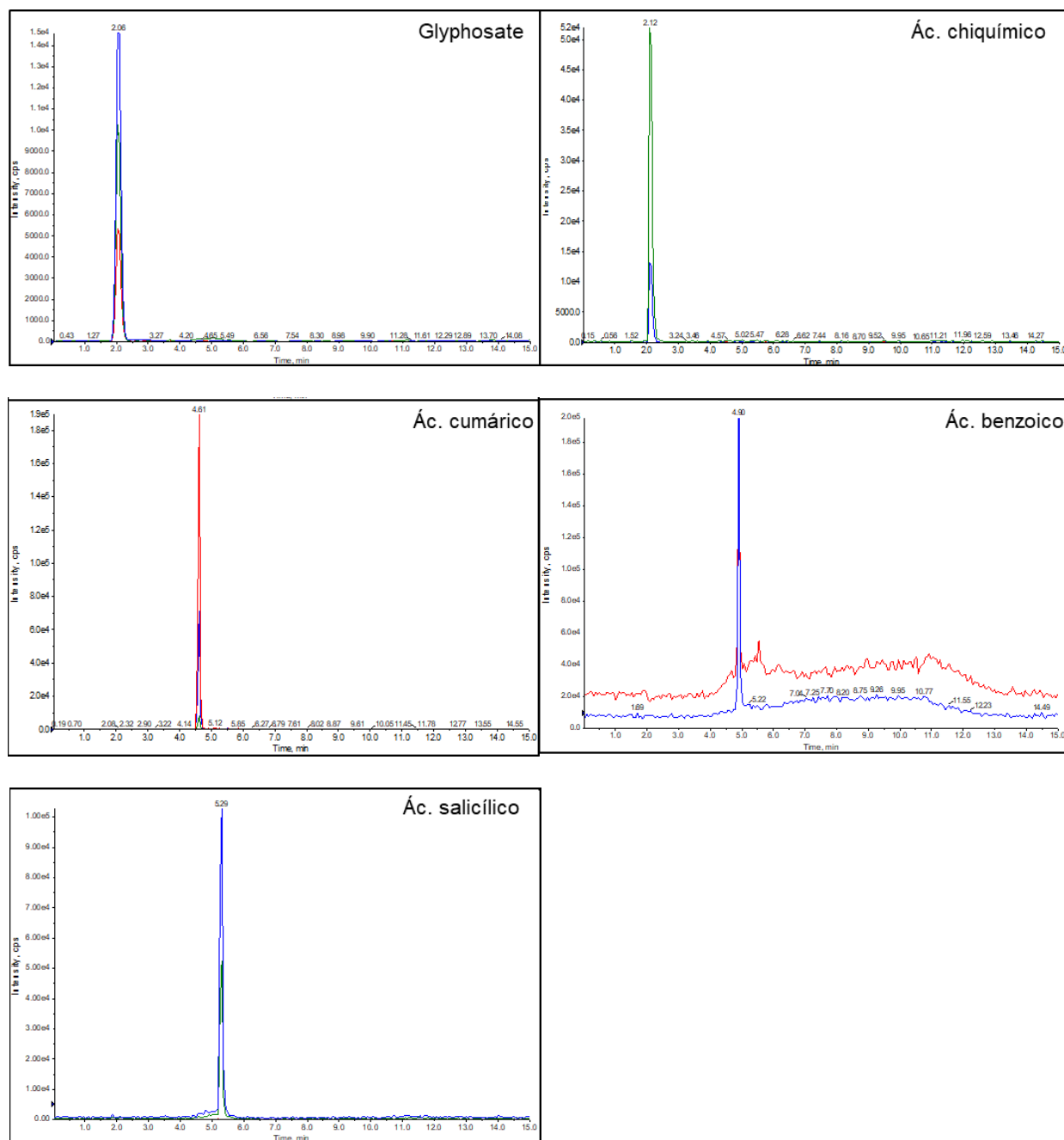
CESB. Comitê Estratégico Soja Brasil **Publicações**. Disponível em: <http://www.cesbrasil.org.br/publicacoes/>. Acessado em: 20 de fevereiro de 2021.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Sétimo levantamento da safra de grãos. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acessado em: 20 de fevereiro de 2021.

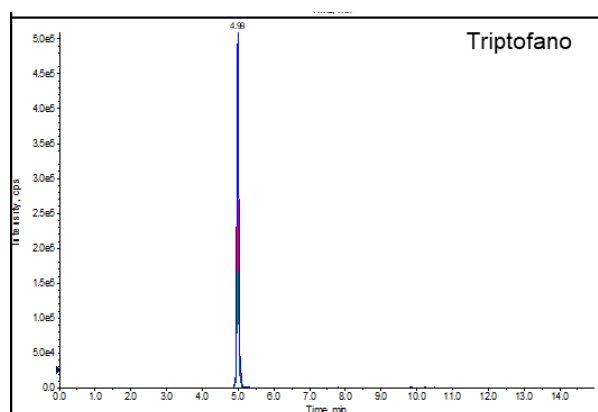
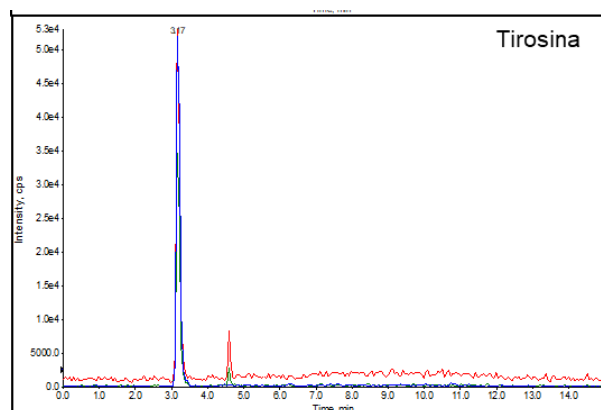
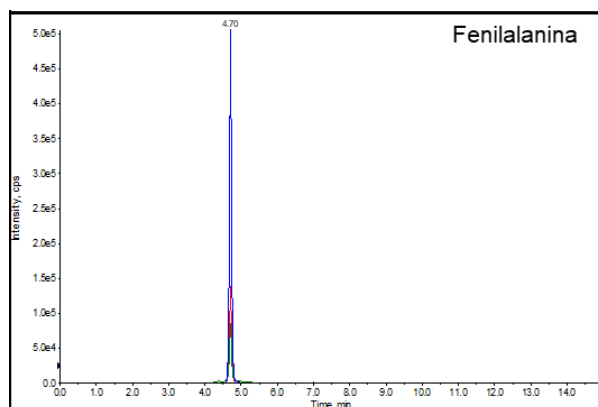
RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. 6 ed. Londrina: IAPAR, 2011. 697 p.

APÊNDICES

Apêndice A – Cromatogramas do glyphosate, ácido chiquímico, ácido cumárico, ácido benzoico e ácido salicílico gerados na concentração de 37,5 ng mL⁻¹



Apêndice B - Cromatogramas dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano gerados na concentração de 37,5 ng mL⁻¹



Apêndice C - Enriquecimento de GO de processo biológico completo dos DEG da cultivar de soja NR CD383, 10 dias após a aplicação de subdoses 11,25 e 22,5 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via aplicação foliar.

GO Processo biológico completo	# genes	DEG	Esperado	(E)	P
NR –11,25 g e.a ha⁻¹					
<i>Edição de adenosina para inosina</i>	9	1	0,01	>100	0,000716
NR – 22,5 g e.a ha⁻¹					
<i>Processo metabólico da flavonóides</i>	10	1	0,01	99,72	0,011
<i>Processo metabólico UDP-rhamnose</i>	10	1	0,01	99,72	0,011
<i>Processo metabólico UDP-glucuronate</i>	10	1	0,01	99,72	0,011
<i>Processo biossintético de glicosaminoglicano</i>	10	1	0,01	99,72	0,011
<i>Processo biossintético de triglicerídeos</i>	24	2	0,02	83,1	0,00031
<i>Processo biossintético de ácido jasmônico</i>	16	1	0,02	62,33	0,016
<i>Desenvolvimento meristemático</i>	20	1	0,02	49,86	0,020
<i>Processo metabólico oxilipina</i>	49	2	0,05	40,7	0,001
<i>Regulação da forma celular</i>	50	2	0,05	39,89	0,001
<i>Processo biossintético de trealose</i>	28	1	0,03	35,62	0,028
<i>Processo metabólico trealose</i>	29	1	0,03	34,39	0,029
<i>Meiose II</i>	30	1	0,03	33,24	0,031

<i>Sinalização mediada por auxina</i>	31	1	0,03	32,17	0,031
<i>Floema ou xilema histogênese</i>	48	1	0,05	20,78	0,047
<i>Processo biossintético de dissacarídeo</i>	50	1	0,05	19,95	0,046
<i>Organização de filamento da actina</i>	138	2	0,14	14,45	0,008
<i>Biogênese da parede celular</i>	186	2	0,19	10,72	0,015
<i>Processo biossintético de carboidrato celular</i>	309	2	0,31	6,45	0,039
<i>Divisão celular</i>	312	2	0,31	6,39	0,039
<i>Processo biossintético do ácido carboxílico</i>	644	3	0,65	4,65	0,027

Apêndice D - Enriquecimento de GO de processo biológico completo dos DEG da cultivar de soja RR BMX Tornado, 10 dias após a aplicação de 45 e 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via aplicação foliar.

GO Processo biológico completo	# genes	DEG	Esperado	(E)	P
RR – 45 g e.a ha⁻¹					
<i>Importação de cálcio para a mitocôndria</i>	17	1	0,01	>100	0,0067
<i>Transporte de Zinco via transmembrana</i>	36	1	0,01	73,87	0,013
<i>Processo catabólico de lignina</i>	51	1	0,02	52,14	0,019
<i>Processo metabólico da sacarose</i>	58	1	0,02	45,85	0,021
<i>Resposta a espécies reativas de oxigênio</i>	104	1	0,04	25,57	0,038
<i>Resposta a estresse osmótico</i>	106	1	0,04	25,09	0,39
RR – 90 g e.a ha⁻¹					
<i>Dna ligase</i>	4	1	0,01	>100	0,0087
<i>Regulação da macroautofagia</i>	7	1	0,01	81,41	0,013
<i>Alongamento de ácidos graxos</i>	14	1	0,02	40,7	0,026
<i>RNA envolvido no silenciamento de genes</i>	41	3	0,07	41,7	0,00065
<i>Transporte lisossomal</i>	14	1	0,02	40,7	0,026
<i>Processo metabólico de ácidos graxos de cadeia muito longa</i>	24	1	0,04	23,74	0,042

<i>Importação de cálcio para a mitocôndria</i>	17	1	0,03	33,52	0,031
<i>Morte celular induzida por simbionte</i>	22	1	0,04	25,9	0,039
<i>Processo metabólico de (1-> 3) -beta-D-glucano</i>	23	1	0,04	24,78	0,041
<i>Regulação da via de sinalização de ácido salicílico</i>	25	1	0,04	22,79	0,044
<i>Processo metabólico de citocinina</i>	70	2	0,12	16,28	0,007
<i>Transporte de vesículas ao longo do filamento de actina</i>	26	1	0,05	21,92	0,046
<i>Resposta a espécies reativas de oxigênio</i>	385	3	0,68	4,44	0,031
<i>Resposta a estresse osmótico</i>	106	2	0,18	10,75	0,015

Apêndice E - Enriquecimento de GO de processo biológico completo dos DEG da cultivar de soja RR2 M5917, 10 dias após a aplicação de 45 e 90 g e.a ha⁻¹ de glyphosate via aplicação foliar.

GO Processo biológico completo	# genes	DEG	Esperado	(E)	P
RR2 – 45 g e.a ha⁻¹					
<i>Processo catabólico de urato</i>	5	1	0,01	74,46	0,016
<i>Proteína ADP-ribosilação</i>	9	1	0,02	41,37	0,026
<i>Regulação negativa do processo apoptótico</i>	7	1	0,02	53,19	0,021
<i>Processo metabólico do ácido jasmônico</i>	42	2	0,11	17,73	0,020
<i>Processo metabólico do ácido L-ascórbico</i>	23	2	0,06	32,37	0,031
<i>Resposta celular ao íon cálcio</i>	11	1	0,03	33,85	0,031
<i>Oxidação de NADH</i>	11	1	0,03	33,85	0,039
<i>Transporte de ceramida</i>	14	1	0,04	26,59	0,047
<i>Processo metabólico de glicerol-3-fosfato</i>	17	1	0,05	21,9	0,005
<i>Resposta a bacterias</i>	128	3	0,34	8,73	0,007
<i>Processo do sistema imonológico</i>	284	4	0,76	5,24	0,007
RR2 – 90 g e.a ha⁻¹					
<i>Formação do tecido vascular da folha</i>	9	1	0,01	>100	0,005
<i>Via de dobramento da tubulina pós-chaperonina</i>	9	1	0,01	>100	0,005

<i>Oxidação de NADH</i>	11	1	0,01	>100	0,006
<i>Conjunto de complexo de tubulina</i>	13	1	0,01	>100	0,007
<i>Transição G1 / S do ciclo celular mitótico</i>	14	1	0,01	>100	0,008
<i>Processo catabólico de L-serina</i>	16	1	0,01	>100	0,009
<i>Processo metabólico de glicerol-3-fosfato</i>	17	1	0,01	>100	0,009
<i>Processo metabólico da glicina</i>	39	1	0,02	46,19	0,022
<i>Processo metabólico de ácido fólico</i>	24	1	0,01	75,06	0,013
<i>Processo catabólico da lignina</i>	51	2	0,03	70,65	0,0004
<i>Processo metabólico de tetraidrofolato</i>	50	1	0,03	36,03	0,027
<i>Regulação da transição G2 / M do ciclo celular mitótico</i>	33	1	0,02	54,59	0,018
<i>Histogênese do floema ou xilema</i>	48	1	0,03	37,53	0,026
<i>Processo catabólico da pectina</i>	174	2	0,10	20,71	0,043
<i>Organização da parede celular</i>	89	1	0,05	20,24	0,048
<i>Via de sinalização por auxina</i>	590	3	0,33	9,16	0,042